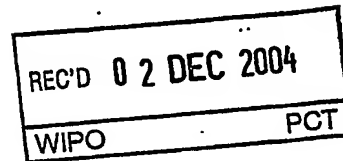


Europäisches  
PatentamtEuropean Patent  
OfficeOffice européen  
des brevets

20.11.2004

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Bescheinigung****Certificate****Attestation**

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den  
The Hague,  
La Haye, le

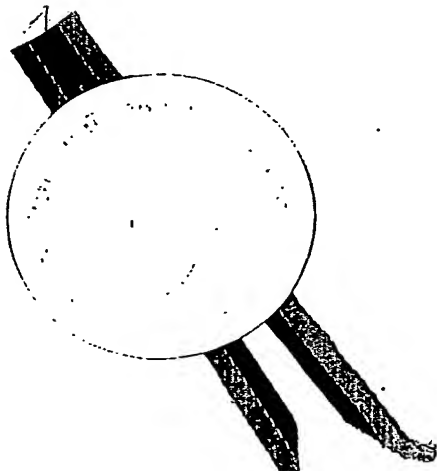
- 3 SEP 2004

Der Präsident des Europäischen Patentamts  
Im Auftrag  
For the President of the European Patent Office  
Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

M. de Jong-de Koster

Patentanmeldung Nr.  
Patent application no.  
Demande de brevet n°

PCT/EP 03/09109





Anmeldung Nr.:  
Application no.:  
Demande n°:

PCT/EP 03/09109

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):

1. SUNGENE GMBH & CO. KGAA - Gatersleben, Deutschland
2. BASF AKTIENGESELLSCHAFT - Ludwigshafen, Deutschland
3. BASF PLANT SCIENCE GMBH - Ludwigshafen, Deutschland

Bezeichnung der Erfindung:

Title of the invention:

Titre de l'invention:

Verfahren von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung  
Tagetes als Futtermittel

Anmeldetag:  
Date of filing:  
Date de dépôt:

18. August 2003 (18.08.2003)

In Anspruch genommene Priorität(en)  
Priority(ies) claimed  
Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:  
State:  
Pays:

Deutschland

Tag:

Date:

Date: 13. November 2002

Aktenzeichen:

File no.

Numéro de dépôt: 10253112.9

Benennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)  
Designation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)  
Désignation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

Bemerkungen:

Remarks:

Remarques:

Weitere Anmelder:

4. FLACHMAN, Ralf - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
5. SAUER, Matt - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
6. SCHOPFER, Christel Renate - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
7. KLEBSATTEL, Martin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
8. KLEBSATTEL, Nartin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
9. PFEIFFER, Angelika-Maria - Mannheim, Deutschland (nur US)
10. LUCK, Thomas - Neustadt, Deutschland (nur US)
11. VOESTE, Dirk - Schifferstadt, Deutschland (nur US)

**Weitere Prioritätsansprüche:**

Deutschland	16. Dezember 2002 (16.12.2002)	10258971.2
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238980.2
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238978.0
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238979.9

IV-1	Anwalt oder gemeinsamer Vertreter; oder besondere Zustellanschrift Die unten bezeichnete Person ist/wird hiermit bestellt, um den (die) Anmelder vor den internationalen Behörden zu vertreten, und zwar als:	<b>gemeinsamer Vertreter</b>
IV-1-1	Name	<b>BASF AKTIENGESELLSCHAFT</b>
IV-1-2	Anschrift:	<b>. .  D-67056 Ludwigshafen Deutschland</b>
IV-1-3	Telefonnr.	<b>(0621) 60-94182</b>
IV-1-4	Telefaxnr.	<b>(0621) 60-52538</b>
V	Bestimmung von Staaten	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	<b>AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist</b> <b>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</b> <b>EP: AT BE BG CH&amp;LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</b> <b>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist</b>
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	<b>AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&amp;LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW</b>



Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

#### Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen, die Tierfutterzubereitungen selbst, ein Verfahren zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmentierter Tiere und Tierprodukte.

10

Aufgrund seiner farbgebenden Eigenschaften wird Astaxanthin als Pigmentierstoff in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpzucht verwendet.

15

Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliches Astaxanthin, wird heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

20

Synthetisches oder durch Isolierung gewonnenes natürliches Astaxanthin wird durch spezielle Formulierungstechniken zur Erhöhung der Lagerfähigkeit chemisch und/oder physikalisch stabilisiert und für den jeweiligen Verwendungszweck entsprechend der gewünschten Applikationsbereiche und Bioverfügbarkeiten aufbereitet.

25

WO 9201754 beschreibt eine astaxanthinhaltige Wildtyppflanze der Spezies *Adonis aestivalis*. Ferner offenbart das Dokument die Verwendung der astaxanthinhaltigen Petalen von *Adonis aestivalis* sowie deren Extrakte als Fischfutter oder als Zusatz in Fischfutter zur Pigmentierung von Fischen.

30

Die Verwendung von *Adonis aestivalis* als pflanzliche Quelle für Astaxanthin zur Pigmentierung von Fischen im Stand der Technik weist jedoch den Nachteil auf, dass der Ertrag an astaxanthinhaltiger Biomasse und damit an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial pro Anbaufläche sehr gering ist, und somit nur doch kostenintensiven Anbau großer Flächen eine befriedigende Menge an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial erhal-

35

ten werden kann. Dies führt zu hohen Kosten bei der Herstellung entsprechender Pigmentiermittel.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, Pigmentiermittel zur Verfügung zu stellen, die den Nachteil des Standes der Technik nicht mehr aufweisen.

Demgemäss wurde gefunden, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur oralen Verabreichung an Tiere verwendet werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet.

Unter astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung *Tagetes* werden bevorzugt Pflanzen der Gattung *Tagetes* verstanden, die in mindestens einem Teil der Pflanze einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Das Astaxanthin kann in freier Form in Form von Fettsäure-Di- oder Monoester vorliegen. Bevorzugte Pflanzen der Gattung *Tagetes* sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, die auch als Marigold bezeichnet werden, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta*, *Tagetes lemmonii*, *Tagetes tenuifolia*, oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta* oder *Tagetes patula*.

Unter astaxanthinhaltigen Pflanzenteilen von Pflanzen der Gattung *Tagetes* werden vorzugsweise Teile von Pflanzen verstanden, die in mindestens einem Teil des Pflanzenteils einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Bevorzugte Pflanzenteile sind beispielsweise Blüten, Blütenköpfe oder besonders bevorzugt Blütenblätter, die auch als Petalen bezeichnet werden.

Wildtyppflanzen der Gattung *Tagetes* weisen kein Astaxanthin jedoch Carotinoide wie Lutein und Zeaxanthin in Blüten auf. Es wurde jedoch erfindungsgemäss gefunden, dass die Pflanzen der Gattung *Tagetes* beispielsweise durch genetische Veränderung in die Lage versetzt werden können, Astaxanthin herzustellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Pflanzen der Gattung *Tagetes* beispielsweise dadurch in die Lage versetzt Astaxanthin herzustellen, indem in den genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* im Vergleich zum Wildtyp eine Ketolase-Aktivität verursacht wird.

5

Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-

10

Gruppe einzuführen.

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

15

Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

20

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß die entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangspflanze der Gattung *Tagetes* verstanden.

Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) der Gattung *Tagetes* oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze der Gattung *Tagetes* oder beides verstanden werden.

25

Vorzugsweise wird unter "Wildtyp" für die Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, und für die nachstehend beschriebene Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Astaxanthin

30

jeweils eine Referenzpflanze verstanden.

Diese Referenzpflanze der Gattung *Tagetes* ist *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*, ganz besonders bevorzugt *Tagetes erecta* L., Accession number: TAG 72, Sorte Orangenprinz, erhältlich aus der Genbank des

35

IPK, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben.

Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

5

Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen Extrakten wird mit den Substraten beta-Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt.

10

Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

Die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze der Gattung *Tagetes* weist in dieser, bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität, vorzugsweise in Blütenblättern, auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, transgen eine Ketolase zu exprimieren.

15

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Ketolase-Aktivität in den Pflanzen der Gattung *Tagetes* durch Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase.

20

In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren in die Ausgangspflanze der Gattung *Tagetes*.

25

Dazu kann prinzipiell jedes Ketolase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Ketolase codiert verwendet werden.

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

30

Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze der Gattung *Tagetes* nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

35

Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Ketolase-  
sen, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können sind beispiels-  
weise Sequenzen aus

- 5 Haematoccus pluvialis, insbesondere aus Haematoccus pluvialis Flotow em. Wille (Ac-  
cession NO: X86782; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

Haematoccus pluvialis, NIES-144 (Accession NO: D45881; Nukleinsäure: SEQ ID  
NO: 3, Protein SEQ ID NO: 4),

10

Agrobacterium aurantiacum (Accession NO: D58420; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5,  
Protein SEQ ID NO: 6),

- 15 Alicaligenes spec. (Accession NO: D58422; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 7, Protein SEQ  
ID NO: 8),

Paracoccus marcusii (Accession NO: Y15112; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 9, Protein  
SEQ ID NO: 10).

- 20 Synechocystis sp. Strain PC6803 (Accession NO: NP442491; Nukleinsäure: SEQ ID  
NO: 11, Protein SEQ ID NO: 12).

Bradyrhizobium sp. (Accession NO: AF218415; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 13, Protein  
SEQ ID NO: 14).

25

Nostoc sp. Strain PCC7120 (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure:  
SEQ ID NO: 15, Protein SEQ ID NO: 16),

- 30 *Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000195, Basen-  
paar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 81); Protein: Acc.-No. ZP\_00111258 (SEQ ID  
NO: 82) (als putatives Protein annotiert),

*Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000196, Basen-  
paar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 83), Protein: (SEQ ID NO: 84) (nicht annotiert),

35

*Synechococcus sp. WH 8102*, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABD01000001, Basenpaar 1,354,725-1,355,528 (SEQ ID NO: 85), Protein: Acc.-No. ZP\_00115639 (SEQ ID NO: 86) (als putatives Protein annotiert),

- 5 *Haematococcus pluvialis* (Accession NO: AF534876, AAN03484; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 97, Protein : SEQ ID NO: 98),

*Paracoccus sp. MBIC1143*, (Accession NO: D58420, P54972; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 99, Protein : SEQ ID NO: 100),

10

*Brevundimonas aurantiaca* (Accession NO: AY166610, AAN86030; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 101, Protein : SEQ ID NO: 102),

- 15 *Nodularia spumigena* NSOR10 (Accession NO: AY210783, AAO64399; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 103, Protein : SEQ ID NO: 104) und

*Deinococcus radiodurans* R1 (Accession NO: E75561, AE001872; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 105, Protein : SEQ ID NO: 106).

- 20 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 leicht auffinden.

25

Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

30

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

35

Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

5

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50\_C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50\_C, bevorzugt bei 65\_C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

10

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22\_C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65\_C angehoben werden.

15

Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42\_C ausgeführt.

20

Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrill sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

25

(i) 4X SSC bei 65\_C, oder

(ii) 6X SSC bei 45\_C, oder

30

(iii) 6X SSC bei 68\_C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

(iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68\_C, oder

35

(v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42\_C, oder

(vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42\_C, oder

5 (vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42\_C, oder

(viii) 2X oder 4X SSC bei 50\_C (moderate Bedingungen), oder

10 (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42\_ (moderate Bedingungen).

(2) Waschschriffe für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel

15 (i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50\_C, oder

(ii) 0.1X SSC bei 65\_C, oder

(iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68\_C, oder

20 (iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42\_C, oder

(v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42\_C, oder

(vi) 2X SSC bei 65\_C (moderate Bedingungen).

25

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine

30 Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

35



Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 16 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

Gap penalty 10

10 Gap length penalty 10

Pairwise alignment parameter:

K-tuple 1

Gap penalty 3

Window 5

15 Diagonals saved 5

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der tagetesspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene von Pflanzen der Gattung Tagetes leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 in die Pflanze der Gattung ein.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 in die Pflanze der Gattung ein.

Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann  
5 beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in  
10 Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

15 Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, daß die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt, funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen  
20 Promotor in die Pflanze der Gattung *Tagetes* eingebracht.

Besonders bevorzugte Pflanzen der Gattung *Tagetes* als Ausgangspflanzen oder erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, die auch als Marigold bezeichnet werden,  
25 *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta*, *Tagetes lemmonii*, *Tagetes tenuifolia*, oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta* oder *Tagetes patula*.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes* verwendet, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.  
30

Unter Hydroxylase-Aktivität die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

- 5 Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

10 Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

- 15 Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

20 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

Unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\beta$ -Cyclase verstanden.

- 25 Unter einer  $\beta$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\beta$ -Ionon-Ring zu überführen.

30 Insbesondere wird unter einer  $\beta$ -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\gamma$ -Carotin in  $\beta$ -Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. gebildete Menge  $\beta$ -Carotin verstanden.

Bei einer erhöhten  $\beta$ -Cyclase –Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase die umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. die gebildete Menge  $\beta$ -Carotin erhöht.

- 5 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase–Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der  $\beta$ -Cyclase–Aktivität des Wildtyps.

- 10 Die Bestimmung der Hydroxylase–Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 15 Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie beta-Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

- 20 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase–Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

- 25 Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden, (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Pflanzenextrakt in unterschiedlichem Volumen.
- 30 Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

Die Bestimmung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 5 Die Aktivität der  $\beta$ -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP<sup>+</sup>, NADPH und ATP zugegeben.
- 10 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

- 15 Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 250  $\mu$ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 250  $\mu$ g an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe
- 20 von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

- 25 Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder von Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase gegenüber dem Wildtyp.
- 30

- Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens durch Akti-
- 35

vatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder  $\beta$ -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine  $\epsilon$ -Cyclase in die Pflanze der Gattung Tagetes.

5

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Pflanzen der Gattung Tagetes eigenen, endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase verstanden.

10

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder  $\beta$ -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

15

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

20

Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der nicht transformierten Pflanze nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

25

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase in die Pflanze der Gattung Tagetes.

35

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes  $\beta$ -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine  $\beta$ -Cyclase codiert, verwendet werden.

- 5 Bei genomischen Hydroxylase-bzw.  $\beta$ -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

10

Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18).

- 15 sowie Hydroxylasen der folgenden Accession Nummern:

lembI CAB55626.1, CAA70427.1, CAA70888.1, CAB55625.1, AF499108\_1, AF315289\_1, AF296158\_1, AAC49443.1, NP\_194300.1, NP\_200070.1, AAG10430.1, CAC06712.1, AAM88619.1, CAC95130.1, AAL80006.1, AF162276\_1, AAO53295.1, AAN85601.1, CRTZ\_ERWHE, CRTZ\_PANAN, BAB79605.1, CRTZ\_ALCSP, CRTZ\_AGRAU, CAB56060.1, ZP\_00094836.1, AAC44852.1, BAC77670.1, NP\_745389.1, NP\_344225.1, NP\_849490.1, ZP\_00087019.1, NP\_503072.1, NP\_852012.1, NP\_115929.1, ZP\_00013255.1

- 25 Eine besonders bevorzugte Hydroxylase ist weiterhin die Hydroxylase aus Tomate (Accession Y14809) (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 107; Protein: SEQ ID NO. 108).

Beispiele für  $\beta$ -Cyclase-Gene sind:

eine Nukleinsäure, codierend eine  $\beta$ -Cyclase aus Tomate (Accession

- 30 X86452).(Nukleinsäure: SEQ ID NO: 19, Protein: SEQ ID NO: 20),.

Sowie  $\beta$ -Cyclasen der folgenden Accession Nummern:

S66350 lycopene beta-cyclase (EC 5.5.1.-) - tomato

- 35 CAA60119 lycopene synthase [*Capsicum annuum*]



- S66349 lycopene beta-cyclase (EC 5.5.1.-) - common tobacco  
 CAA57386 lycopene cyclase [*Nicotiana tabacum*]  
 AAM21152 lycopene beta-cyclase [*Citrus sinensis*]  
 AAD38049 lycopene cyclase [*Citrus x paradisi*]  
 5 AAN86060 lycopene cyclase [*Citrus unshiu*]  
 AAF44700 lycopene beta-cyclase [*Citrus sinensis*]  
 AAK07430 lycopene beta-cyclase [*Adonis palaestina*]  
 AAG10429 beta cyclase [*Tagetes erecta*]  
 AAA81880 lycopene cyclase  
 10 AAB53337 Lycopene beta cyclase  
 AAL92175 beta-lycopene cyclase [*Sandersonia aurantiaca*]  
 CAA67331 lycopene cyclase [*Narcissus pseudonarcissus*]  
 AAM45381 beta cyclase [*Tagetes erecta*]  
 AAO18661 lycopene beta-cyclase [*Zea mays*]  
 15 AAG21133 chromoplast-specific lycopene beta-cyclase [*Lycopersicon esculentum*]  
 AAF18989 lycopene beta-cyclase [*Daucus carota*]  
 ZP\_001140 hypothetical protein [*Prochlorococcus marinus* str. MIT9313]  
 ZP\_001050 hypothetical protein [*Prochlorococcus marinus* subsp. *pastoris* str. CCMP1378]  
 20 ZP\_001046 hypothetical protein [*Prochlorococcus marinus* subsp. *pastoris* str. CCMP1378]  
 ZP\_001134 hypothetical protein [*Prochlorococcus marinus* str. MIT9313]  
 ZP\_001150 hypothetical protein [*Synechococcus* sp. WH 8102]  
 AAF10377 lycopene cyclase [*Deinococcus radiodurans*]  
 25 BAA29250 393aa long hypothetical protein [*Pyrococcus horikoshii*]  
 BAC77673 lycopene beta-monocyclase [marine bacterium P99-3]  
 AAL01999 lycopene cyclase [*Xanthobacter* sp. Py2]  
 ZP\_000190 hypothetical protein [*Chloroflexus aurantiacus*]  
 ZP\_000941 hypothetical protein [*Novosphingobium aromaticivorans*]  
 30 AAF78200 lycopene cyclase [*Bradyrhizobium* sp. ORS278]  
 BAB79602 crtY [*Pantoea agglomerans* pv. *milletiae*]  
 CAA64855 lycopene cyclase [*Streptomyces griseus*]  
 AAA21262 dycopene cyclase [*Pantoea agglomerans*]  
 C37802 crtY protein - *Erwinia uredovora*  
 35 BAB79602 crtY [*Pantoea agglomerans* pv. *milletiae*]

AAA64980 lycopene cyclase [Pantoea agglomerans]

AAC44851 lycopene cyclase

BAA09593 Lycopene cyclase [Paracoccus sp. MBIC1143]

ZP\_000941 hypothetical protein [Novosphingobium aromaticivorans]

5 CAB56061 lycopene beta-cyclase [Paracoccus marcusii]

BAA20275 lycopene cyclase [Erythrobacter longus]

ZP\_000570 hypothetical protein [Thermobifida fusca]

ZP\_000190 hypothetical protein [Chloroflexus aurantiacus]

AAK07430 lycopene beta-cyclase [Adonis palaestina]

10 CAA67331 lycopene cyclase [Narcissus pseudonarcissus]

AAB53337 Lycopene beta cyclase

BAC77673 lycopene beta-monocyclase [marine bacterium P99-3]

15 Eine besonders bevorzugte  $\beta$ -Cyclase ist weiterhin die chromoplastenspezifische  $\beta$ -Cyclase aus Tomate (AAG21133) (Nukleinsäure: SEQ ID No. 109; Protein: SEQ ID No. 110)

20 In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen der gattung Tagetes liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gen vor.

25 In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase auf.

30 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase  
35 aufweisen.

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der  
5    Seq ID. NO: 18 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch  
10    Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 18.  
15

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.  
20

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 17 in den Organismus ein.  
25

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als  $\beta$ -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\beta$ -Cyclase aufweisen.  
30

35

Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 20 leicht auffinden.

5

Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 19 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 20.

15

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

20

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 19 in den Organismus ein.

25

Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder  $\beta$ -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klon-

30

nierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

- 5 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Pflanzen der Gattung *Tagetes* gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität auf.

Unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase verstanden.

- 10 Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\epsilon$ -Ionon-Ring zu überführen.

- 15 Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in  $\delta$ -Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge  $\delta$ -Carotin verstanden.

20

Bei einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge  $\delta$ -Carotin reduziert.

- 25 Unter einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer  $\epsilon$ -Cyclase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

30

Die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge, oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestim-

mung der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

Eine Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer  $\epsilon$ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der  $\epsilon$ -Cyclase). Vorzugsweise wird die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. die  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder die  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. des  $\epsilon$ -Cyclase-Proteins oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA).

Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP<sup>+</sup>, NADPH und ATP zugegeben werden.

Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.01 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplast; J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,
- b) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuresequenzen,
- c) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- d) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA genannt, zur Induktion einer Ko-suppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette

- f) Einbringen mindestens einer den  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette

5

- g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebung im Leseraster, an einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes  $\epsilon$ -Cyclase-Gen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen  $\epsilon$ -Cyclase-Gensequenzen generiert werden.

10

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer  $\epsilon$ -Cyclase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der  $\epsilon$ -Cyclase, des Transports der  $\epsilon$ -Cyclase oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines  $\epsilon$ -Cyclase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

25

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

- 30 a) Einbringen einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA)

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619;

35



WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

- 5 Unter "Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz" wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Waston und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

10

Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

15

Unter einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

20

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

25

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

30

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

35

Unter dem Begriff "ε-Cyclase-Transkript" wird der transkripierte Teil eines ε-Cyclase-Gens verstanden, der neben der ε-Cyclase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

5

Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ε-Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der ε-Cyclase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

10

Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen ε-Cyclase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen ε-Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

15

In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

20

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der ε-Cyclase-dsRNA Teile des ε-Cyclase Transkripts und/oder Teilsequenzen der ε-Cyclase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

25

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die ε-Cyclase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen ε-Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine ε-Cyclase enthält. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken.

5

Ein doppelsträngige RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

10

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

15

Zur Transformation der Pflanze mit einer  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA transkribiert wird.

20

Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und

25

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

30

Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 38 oder ein Teil derselben verstanden.

- 5 "Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der  $\epsilon$ -Cyclase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem
- 10 "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens.

- Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskript
- 15 ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der  $\epsilon$ -Cyclase Sequenz des einen Or-
- 20 ganismus generiert wurde, die  $\epsilon$ -Cyclase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von  $\epsilon$ -Cyclase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

- 25 Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

- 30 "Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Kom-
- 35 plement des "sense"-RNA-Stranges.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA

- 5 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

10

Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

- 15 a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

20

Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 47 oder ein Teil der selben verstanden.

Zur Herstellung der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden

25 Teil-Sequenzen verwendet:

SEQ ID NO: 40: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ ID NO: 41: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

30

SEQ ID NO: 42: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ ID NO: 43: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

35

SEQ ID NO: 47: Sense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

SEQ ID NO: 48: Antisense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle  
5 dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang  
10 und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-  
15 LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).  
20

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.  
25

Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase gerichtet, so umfasst sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze "Spreading").  
30

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

- a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,  
35

b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

5 c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

10 Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

15 Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blüten-spezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

25 Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer  $\epsilon$ -Cyclase -dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor inseriert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.

30

Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

35 b) Einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA)

Verfahren zur Verminderung eines bestimmten Proteins durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu vermindern-  
5  $\epsilon$ -Cyclase. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation der  $\epsilon$ -Cyclase unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung  
10 in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

Eine  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann unter Verwendung der für diese  $\epsilon$ -Cyclase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38 nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die  
15  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der  $\epsilon$ -Cyclase komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die  $\epsilon$ -Cyclase umfasst.  
20 Die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, kann aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen.  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNAs werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt rekombinant in der Zielzelle exprimiert..

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der antisenseRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

30 Besagte Expressionskassetten können Teil eines Transformationskonstruktes oder Transformationsvektors sein, oder aber auch im Rahmen einer Kotransformation eingeführt werden.



In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens (z.B. einem  $\epsilon$ -Cyclase Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens reduziert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) *Anticancer Drug Res* 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) *Ann NY Acad Sci* 660:27-36; Maher LJ (1992) *Bioassays* 14(12):807- 815).

In einer weiteren Ausführungsform kann die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA eine  $\alpha$ -anomere Nukleinsäure sein. Derartige  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen, - im Unterschied zu den konventionellen  $\beta$ -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15:6625-6641).

c) Einbringen einer  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) *FEMS Microbiol Rev* 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beschrieben (u.a. bei Haselhoff et al. (1988) *Nature* 334: 585-591); Haselhoff und Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591; Steinecke P et al. (1992) *EMBO J* 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) *Mol Gen Genet.* 250(3):329-338).

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu vermindern- den  $\epsilon$ -Cyclases katalytisch zu spalten und so die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in

(EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in  
 5 Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden,  
 10 die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden  $\epsilon$ -Cyclases aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

- 15 d) Einbringen einer sense-Ribonukleinsäuresequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA) zur Induktion einer Kosuppression

Die Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz (oder eines Teils derselben) in sense-Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden  
 20  $\epsilon$ -Cyclase-Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen  $\epsilon$ -Cyclasegen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell  
 25 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindernde, homologe Gen ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beschrieben (z.B. Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; in  
 US 5,034,323.

30

Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38. Bevorzugt ist die  $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA so gewählt, dass es nicht zu einer Translation  
 35 der  $\epsilon$ -Cyclase oder eines Teils desselben kommen kann. Dazu kann beispielsweise

der 5'-untranslatierte oder 3'-untranslatierte Bereich gewählt oder aber das ATG-Startkodon deletiert oder mutiert werden.

- e) Einbringen von DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen  $\epsilon$ -Cyclase Gene, -RNAs oder Proteine

Eine Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase Expression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typ der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Verminderung der Expression. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14628- 14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616 -3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen.

Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die die  $\epsilon$ -Cyclase selber inhibieren. Diese proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben (Owen M et al. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

- f) Einbringen von den  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten

Die  $\epsilon$ -Cyclase Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen

- 5  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon; Angell SM et al. (1999) Plant J 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu dem Transkript einer zu vermindernden  $\epsilon$ -Cyclase mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich  
10 mediiert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant Cell 10(6):937-46).

15

Bevorzugt wird die VIGS-vermittelte Verminderung unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein  $\epsilon$ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 .

20

- g) Einbringen von Konstrukten zur Erzeugung eines Funktionsverlustes oder einer Funktionsminderung an  $\epsilon$ -Cyclase-Genen

- 25 Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren bekannt, wie genomische Sequenzen gezielt modifiziert werden können. Dazu zählen insbesondere Verfahren wie die Erzeugung von Knockout-Mutanten mittels gezielter homologen Rekombination z.B. durch Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc. (Hohn B und Puchta H (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323) oder die gezielte Deletion oder Inversion von Sequenzen mittels z.B. sequenzspezifischer Rekombinasen oder  
30 Nukleasen (s.u.)

- Die Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase-Menge, -Funktion und/oder -Aktivität kann auch durch eine gezielte Insertion von Nukleinsäuresequenzen (z.B. der im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahrens zu insertierenden Nukleinsäuresequenz) in die Sequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase (z.B. mittels intermolekularer homologer Rekombination)
- 35

bination) realisiert werden. Im Rahmen dieser Ausführungsform verwendet man bevorzugt ein DNA-Konstrukt, das zumindest einen Teil der Sequenz eines  $\epsilon$ -Cyclasegens oder benachbarter Sequenzen umfasst, und so mit diesen in der Zielzelle gezielt re-

5 kombinieren kann, so dass durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids das  $\epsilon$ -Cyclase-Gen so verändert wird, dass die Funktionalität des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens reduziert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und reduziert wird. Bei der konventionellen  
10 homologen Rekombination ist die zu insertierende Sequenz an ihrem 5'- und/oder 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen (A' bzw. B') flankiert, die eine ausreichende Länge und Homologie zu entsprechenden Sequenzen des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens (A bzw. B) für die Ermöglichung der homologen Rekombination aufweisen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren hundert Basen bis zu mehreren Kilobasen  
15 (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird die pflanzliche Zelle mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone basierend auf der infolge inakti-

20 vierten  $\epsilon$ -Cyclase selektioniert.  
In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Effizienz der Rekombination gesteigert durch Kombination mit Verfahren, die die homologe Rekombination fördern. Solche Verfahren sind beschrieben und umfassen beispielhaft die Expression von Proteinen wie RecA oder die Behandlung mit PARP-Inhibitoren. Es konnte gezeigt wer-  
25 den, dass die intrachromosomale homologe Rekombination in Tabakpflanzen durch die Verwendung von PARP-Inhibitoren erhöht werden kann (Puchta H et al. (1995) Plant J 7:203-210). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren kann die Rate der homologen Rekombination in den Rekombinationskonstrukten nach Induktion des sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbruches und damit die Effizienz der Deletion der Transgen-  
30 sequenzen weiter erhöht werden. Verschiedene PARP Inhibitoren können dabei zum Einsatz kommen. Bevorzugt umfasst sind Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid, 8-Hydroxy-2-methylquinazolin-4-on (NU1025), 1,11b-Dihydro-[2H]benzopyrano-[4,3,2-de]isoquinolin-3-on (GPI 6150), 5-Aminoisoquinolinon, 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidiny)]butoxy]-1(2H)-isoquinolinon oder die in WO 00/26192, WO 00/29384,

WO 00/32579, WO 00/64878, WO 00/68206, WO 00/67734, WO 01/23386 und WO 01/23390 beschriebenen Substanzen.

5 Weitere geeignete Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene Markerprotein Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992, 20(5):963-976). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeraplasty" bekannt sind (Cole-  
10 Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

● Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing"  
15 (PTGS) oder transcriptional gene silencing" (TGS) bezeichnet. PTGS/TGS-Verfahren sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu vermindernenden Markerprotein-Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. So kann man unter Verwendung der Markerprotein-  
20 Nukleinsäuresequenzen aus einer Art auch die Expression von homologen Markerprotein-Proteinen in anderen Arten effektiv vermindern, ohne, dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden Markerprotein-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand.

● 25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:

- 30 a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder
- b) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer  $\epsilon$ -Cyclase aufweisen.

10 Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität blütenspezifisch, besonders bevorzugt blütenblattspezifisch erfolgt.

15 In der vorstehend beschriebenen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors oder noch bevorzugter unter Kontrolle eines blütenblattspezifischen Promotors erfolgt.

20 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Pflanzen kultiviert, die zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

25 Unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A-Reduktase) verstanden.

30 Unter einer HMG-CoA-Reduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A in Mevalonat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase umgesetzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. gebildete Menge Mevalonat verstanden.

- 5 Bei einer erhöhten HMG-CoA-Reduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase die umgesetzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. die gebildete Menge Mevalonat erhöht.
- 10 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität des Wildtyps. Unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer HMG-
- 15 CoA-Reduktase verstanden.

Die Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

20

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 2 mM ε-Aminocapronsäure, 10% Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0.5 mM PMSF zugegeben.

30

Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase kann nach veröffentlichten Beschreibungen gemessen werden (z.B. Schaller, Grausem, Benveniste, Chye, Tan, Song und Chua, Plant Physiol. 109 (1995), 761-770; Chappell, Wolf, Proulx, Cuellar und Saunders, Plant Physiol. 109 (1995) 1337-1343). Pflanzengewebe kann in kaltem Puffer (100 mM Kaliumphosphat (pH 7.0), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT) homogenisiert und extrahiert werden. Das Homogenisat wird 15 Minuten lang bei 10.000g bei 4°C zentrifugiert. Der Ü-

35



- berstand wird danach bei 100.000g für 45-60 Minuten nochmals zentrifugiert. Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase wird im Überstand und im Pellet der mikrosomalen Fraktion (nach dem Resuspendieren in 100 mM Kaliumphosphat (pH 7.0) und 50 mM DTT) bestimmt. Aliquots der Lösung und der Suspension (der Proteingehalt der Suspension entspricht etwa 1-10  $\mu$ g) werden in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0 mit 3 mM NADPH und 20  $\mu$ M ( $^{14}$ C)HMG-CoA (58  $\mu$ Ci/ $\mu$ M) idealerweise in einem Volumen von 26  $\mu$ l für 15-60 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wird terminiert durch die Zugabe von 5  $\mu$ l Mevalonatlacton (1 mg/ml) und 6 N HCl. Nach Zugabe wird die Mischung bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Das in der Reaktion gebildete ( $^{14}$ C)-Mevalonat wird quantifiziert, indem 125  $\mu$ l einer gesättigten Kaliumphosphat-Lösung (pH 6.0) und 300  $\mu$ l Ethylacetat zugegeben werden. Die Mischung wird gut vermischt und zentrifugiert. Mittels Szintillationsmessung kann die Radioaktivität bestimmt werden.
- 15 Unter (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, auch IytB oder IspH bezeichnet, wird die Enzymaktivität einer (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase verstanden.
- 20 Unter einer (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat in Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphate umzuwandeln.
- 25 Dementsprechend wird unter (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase umgesetzte Menge (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Isopentenylidiphosphat und/oder Dimethylallyldiphosphat verstanden.
- 30 Bei einer erhöhten (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase die umgesetzte Menge (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Isopentenylidiphosphat und/oder Dimethylallyldiphosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase –Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocaprönsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

Die Bestimmung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität kann über einen immunologischen Nachweis erbracht werden. Die Herstellung spezifischer Antikörper ist durch Rohdich und Kollegen (Rohdich, Hecht, Gärtner, Adam, Krieger, Amslinger, Arigoni, Bacher und Eisenreich: Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein, Natl. Acad. Natl. Sci. USA 99 (2002), 1158-1163) beschrieben worden. Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität beschreiben Altincicek und Kollegen (Altincicek, Duin, Reichenberg, Hedderich, Kollas, Hintz, Wagner, Wiesner, Beck und Jomaa: LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis; FEBS Letters 532 (2002,) 437-440) ein in vitro-System, welches die Reduktion von (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphat in die Isopentenyl-diphosphat und Dimethylallyldiphosphat verfolgt.

Unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase verstanden.

5 Unter einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Hydroxyethyl-ThPP und Glycerinaldehyd-3-Phosphat in 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat umzuwandeln.

10 Dementsprechend wird unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase –Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase umgesetzte Menge Hydroxyethyl-ThPP und/oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat bzw. gebildete Menge 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat verstanden.

15 Bei einer erhöhten 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase –Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase die umgesetzte Menge Hydroxyethyl-ThPP und/oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat bzw. die gebildete Menge 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat erhöht.

20 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase –Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase–Aktivität des Wildtyps.

25 Die Bestimmung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase–Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

30 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1  
35 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM ε-Aminocapronsäure, 10 %

Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

- Die Reaktionslösung (50-200 µl) für die Bestimmung der D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität (DXS) besteht aus 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM MnCl<sub>2</sub>, 3 mM ATP, 1 mM Thiamindiphosphat, 0.1% Tween-60, 1 mM Kaliumfluorid, 30 µM (2-<sup>14</sup>C)-Pyruvat (0.5 µCi), 0.6 mM DL-Glyceraldehyd-3-phosphat. Der Pflanzenextrakt wird 1 bis 2 Stunden in der Reaktionslösung bei 37°C inkubiert. Danach wird die Reaktion durch Erhitzen auf 80°C für 3 Minuten gestoppt. Nach Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten wird der Überstand evaporiert, der Rest in 50 µl Methanol resuspendiert, auf eine TLC-Platte für Dünnschichtchromatographie (Silica-Gel 60, Merck, Darmstadt) aufgetragen und in N-Propylalkohol-/Ethylacetat/Wasser (6:1:3; v/v/v) aufgetrennt. Dabei trennt sich radioaktiv markiertes D-1-deoxyxylulose-5-phosphat (oder D-1-deoxyxylulose) von (2-<sup>14</sup>C)-Pyruvat. Die Quantifizierung erfolgt mittels Scintillationszähler. Die Methode wurde beschrieben in Harker und Bramley (FEBS Letters 448 (1999) 115-119). Alternativ wurde ein fluorometrischer Assay zur Bestimmung der DXS-Synthaseaktivität von Querol und Kollegen beschrieben (Analytical Biochemistry 296 (2001) 101-105).
- 20 Unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase verstanden.

- Unter einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat in β-Carotin umzuwandeln.
- 25

- Dementsprechend wird unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase – Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase umgesetzte Menge 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat bzw. gebildete Menge Isopenetenyl-Diphosphat verstanden.
- 30

Bei einer erhöhten 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase –Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase die umgesetzte Menge

1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat bzw. die gebildete Menge Isopentenyl-Diphosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-

- 5 Reduktoisomerase –Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugt mindestens 300 %, noch bevorzugt mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase –Aktivität des Wildtyps.

- 10 Die Bestimmung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase –Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 15 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1  
20 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

- 25 Die Aktivität der D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase (DXR) wird gemessen in einem Puffer aus 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,3 mM NADPH und 0,3 mM 1-Deoxy-D-Xylulose-4-Phosphat, welches z.B. enzymatisch synthetisiert werden kann (Kuzuyama, Takahashi, Watanabe und Seto: Tetrahedon letters 39 (1998) 4509-4512). Die Reaktion wird durch Zugabe des Pflanzenextraktes gestartet. Das Reaktionsvolumen kann typischerweis 0,2 bis 0,5 mL betragen; die Inkubation  
30 erfolgt bei 37°C über 30-60 Minuten. Während dieser Zeit wird die Oxidation von NADPH photometrisch bei 340 nm verfolgt.

Unter Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase verstanden.

Unter einer Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Isopentenyl-Diphosphat in Dimethylallylphosphat umzuwandeln.

- 5 Dementsprechend wird unter Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Dimethylallylphosphat verstanden.
- 10 Bei einer erhöhten Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase die umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Dimethylallylphosphat erhöht.
- 15 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase – Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase Aktivität des Wildtyps.
- 20 Die Bestimmung der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:
- 25 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, 10 %
- 30 Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

Aktivitätsbestimmungen der Isopentenyl-Diphosphat-Isomerase (IPP-Isomerase) können nach der von Fraser und Kollegen vorgestellten Methode (Fraser, Römer, Shipton, Mills, Kiano, Misawa, Drake, Schuch und Bramley: Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner; Proc.

- 5 Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002), 1092-1097, basierend auf Fraser, Pinto, Holloway und Bramley, Plant Journal 24 (2000), 551-558) durchgeführt werden. Für Enzymmessungen werden Inkubationen mit  $0,5 \mu\text{Ci}$  ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ )IPP (Isopentenylpyrophosphat) ( $56 \text{ mCi/mmol}$ , Amersham plc) als Substrat in  $0,4 \text{ M}$  Tris-HCl (pH 8,0) mit  $1 \text{ mM}$  DTT,  $4 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $6 \text{ mM}$   $\text{MnCl}_2$ ,  $3 \text{ mM}$  ATP,  $0,1 \%$  Tween 60,  $1 \text{ mM}$  Kaliumfluorid in einem
- 10 Volumen von etwa  $150\text{-}500 \mu\text{l}$  durchgeführt. Extrakte werden mit Puffer gemischt (z.B. im Verhältnis 1:1) und für wenigstens 5 Stunden bei  $28^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach wird etwa  $200 \mu\text{l}$  Methanol zugegeben und durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure (Endkonzentration  $25 \%$ ) eine Säurehydrolyse für etwa 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt. Anschließend erfolgt eine zweimalige Extraktion (jeweils  $500 \mu\text{l}$ ) mit Petrolether (versetzt
- 15 mit  $10\%$  Diethylether). Die Radioaktivität in einem Aliquot der Hyperphase wird mittels Szintillationszähler bestimmt. Die spezifische Enzymaktivität kann bei kurzer Inkubation von 5 Minuten bestimmt werden, da kurze Reaktionszeiten die Bildung von Reaktionsnebenprodukten unterdrückt (siehe Lützow und Beyer: The isopentenyl-diphosphate  $\Delta$ -isomerase and its relation to the phytoene synthase complex in daffodil chromoplasts;
- 20 Biochim. Biophys. Acta 959 (1988), 118-126)

Unter Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Geranyl-Diphosphat-Synthase verstanden.

- 25 Unter einer Geranyl-Diphosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Isopentenyl-Diphosphat und Dimethylallylphosphat in Geranyl-Diphosphat umzuwandeln.

- 30 Dementsprechend wird unter Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Diphosphat-Synthase umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat und/oder Dimethylallylphosphat bzw. gebildete Menge Geranyl-Diphosphat verstanden.

- 35 Bei einer erhöhten Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Gera-

nyl-Diphosphat-Synthase die umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat und/oder Dimethylallylphosphat bzw. die gebildete Menge Geranyl-Diphosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Geranyl-Diphosphat-Synthase –Aktivität

- 5 mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugt mindestens 300 %, noch bevorzugt mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Geranyl-Diphosphat-Synthase–Aktivität des Wildtyps.

- 10 Die Bestimmung der Geranyl-Diphosphat-Synthase–Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 15 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1
- 20 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

- 25 Die Aktivität der Geranyl-Diphosphat-Synthase (GPP-Synthase) kann in 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1 mM ATP, 0.2 % Tween-20, 5  $\mu$ M (<sup>14</sup>C)IPP und 50  $\mu$ M DMAPP (Dimethylallylpyrophosphat) nach Zugabe von Pflanzenextrakt bestimmt werden (nach Bouvier, Suire, d'Harlingue, Backhaus und Camara: Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells, Plant Journal 24 (2000,) 241-252). Nach der Inkubation
- 30 von z.B. 2 Stunden bei 37°C werden die Reaktionsprodukte dephosphoryliert (nach Koyama, Fuji und Ogura: Enzymatic hydrolysis of polyprenyl pyrophosphates, Methods Enzymol. 110 (1985), 153-155) und mittels Dünnschichtchromatographie und Messung der inkorporierten Radioaktivität analysiert (Dogbo, Bardat, Quennemet und Camara: Metabolism of plastid terpenoids: In vitro inhibition of phytoene synthesis by phenethyl pyrophosphate derivatives, FEBS Letters 219 (1987) 211-215).
- 35



Unter Farnesyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Farnesyl-Diphosphat-Synthase verstanden.

5 Unter einer Farnesyl-Diphosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Geranyl-Diphosphate und Isopentenyl-Diphosphat in Farnesyl-Diphosphat umzuwandeln.

10 Dementsprechend wird unter Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Farnesyl-Diphosphat-Synthase umgesetzte Menge Geranyl-Diphosphate und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Farnesyl-Diphosphat verstanden.

15 Bei einer erhöhten Farnesyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Farnesyl-Diphosphat-Synthase die umgesetzte Menge Geranyl-Diphosphate und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Farnesyl-Diphosphat erhöht.

20 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität des Wildtyps.

25 Die Bestimmung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert.  
30 Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 %  
35 Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

Die Aktivität der Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPP-Synthase) kann nach einer Vorschrift von Joly und Edwards (Journal of Biological Chemistry 268 (1993), 26983-26989) bestimmt werden. Danach wird die Enzymaktivität in einem Puffer aus 10 mM HEPES (pH 7,2), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol, 20  $\mu$ M Geranylpyrophosphat und 40  $\mu$ M (1-<sup>14</sup>C) Isopentenylpyrophosphat (4 Ci/mmol) gemessen. Die Reaktionsmischung wird bei 37°C inkubiert; die Reaktion wird durch Zugabe von 2,5 N HCl (in 70 % Ethanol mit 19  $\mu$ g/ml Farnesol) gestoppt. Die Reaktionsprodukte werden somit durch Säurehydrolyse bei 37°C innerhalb von 30 Minuten hydrolysiert. Durch Zugabe von 10% NaOH wird die Mischung neutralisiert und mit Hexan ausgeschüttelt. Ein Aliquot der Hexanphase kann zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität mittels Szintillationszähler gemessen werden.

Alternativ können nach Inkubation von Pflanzenextrakt und radioaktiv markierten IPP die Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie (Silica-Gel SE60, Merck) in Benzol/Methanol (9:1) getrennt werden. Radioaktiv markierte Produkte werden eluiert und die Radioaktivität bestimmt (nach Gaffe, Bru, Causse, Vidal, Stamitti-Bert, Carde und Gallusci: LEFPS1, a tomato farnesyl pyrophosphate gene highly expressed during early fruit development; Plant Physiology 123 (2000) 1351-1362).

Unter Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase verstanden.

Unter einer Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Farnesyl-Diphosphat und Isopentenyl-Diphosphat in Geranyl-Geranyl-Diphosphat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase umgesetzte Menge Farnesyl-Diphosphat und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat verstanden.

Bei einer erhöhten Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase die umgesetzte Menge Farnesyl-Diphosphat

und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat erhöht.

- Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase –
- 5 Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der  $\beta$ -Cyclase–Aktivität des Wildtyps.
- 10 Die Bestimmung der Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase –Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:
- 15 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl, 1
- 20 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM  $KHCO_3$ . Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.
- 25 Aktivitätsmessungen der Geranylgeranypyrophosphat-Synthase (GGPP-Synthase) können nach der von Dogbo und Camara beschriebenen Methode (in Biochim. Biophys. Acta 920 (1987), 140-148: Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from Capsicum chromoplasts by affinity chromatography) bestimmt werden. Dazu wird einem Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 2 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $MnCl_2$ , 2 mM Dithiothreitol, ( $1\text{-}^{14}C$ )IPP (0,1  $\mu$ Ci, 10  $\mu$ M), 15  $\mu$ M
- 30 DMAPP, GPP oder FPP) mit einem Gesamtvolumen von etwa 200  $\mu$ l Pflanzenextrakt zugesetzt. Die Inkubation kann für 1-2 Stunden (oder länger) bei 30°C erfolgen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,5 ml Ethanol und 0,1 ml 6N HCl. Nach 10minütiger Inkubation bei 37°C wird die Reaktionsmischung mit 6N NaOH neutralisiert, mit 1 ml Wasser vermischt und mit 4 ml Diethylether ausgeschüttelt. In einem Aliquot (z.B.
- 35 0,2 mL) der Etherphase wird mittels Szintillationszählung die Menge an Radioaktivität

bestimmt. Alternativ können nach Säurehydrolyse die radioaktiv markierten Prenylalkohole in Ether ausgeschüttelt werden und mit HPLC (25 cm-Säule Spherisorb ODS-1, 5 $\mu$ m; Elution mit Methanol/Wasser (90:10; v/v) bei einer Flussrate von 1 ml/min) getrennt und mittels Radioaktivitätsmonitor quantifiziert werden (nach Wiedemann, Misawa und Sandmann: Purification and enzymatic characterization of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Erwinia uredovora* after expression in *Escherichia coli*;

Unter Phytoen-Synthase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Phytoen-Synthase verstanden.

Unter einer Phytoen-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\beta$ -Ionon-Ring zu überführen.

Insbesondere wird unter einer Phytoen-Synthase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Geranyl-Geranyl-Diphosphat in Phytoen umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Phytoen-Synthase –Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Synthase umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Phytoen verstanden.

Bei einer erhöhten Phytoen-Synthase –Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Synthase die umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Phytoen erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Phytoen-Synthase–Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Phytoen-Synthase–Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Phytoen-Synthase–Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert.

Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

Aktivitätsbestimmungen der Phytoenesynthase (PSY) können nach der von Fraser und Kollegen vorgestellten Methode (Fraser, Romer, Shipton, Mills, Kiano, Misawa, Drake, Schuch und Bramley: Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002), 1092-1097, basierend auf Fraser, Pinto, Holloway und Bramley, Plant Journal 24 (2000) 551-558) durchgeführt werden. Für Enzymmessungen werden Inkubationen mit (<sup>3</sup>H)Geranylgeranyl-pyrophosphat (15 mCi/mM, American Radiolabeled Chemicals, St. Louis) als Substrat in 0,4 M Tris-HCl (pH 8,0) mit 1 mM DTT, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM Mn Cl<sub>2</sub>, 3 mM ATP, 0,1 % Tween 60, 1 mM Kaliumfluorid durchgeführt. Pflanzenextrakte werden mit Puffer gemischt, z.B. 295  $\mu$ l Puffer mit Extrakt in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l. Inkubiert wird für wenigstens 5 Stunden bei 28°C. Anschließend wird Phytoene durch zweimaliges Ausschütteln (jeweils 500  $\mu$ l) mit Chloroform extrahiert. Das während der Reaktion gebildete radioaktiv markierte Phytoene wird mittels Dünnschichtchromatographie auf Silicaplatten in Methanol/Wasser (95:5; v/v) getrennt. Phytoene kann in einer Jod-angereicherten Atmosphäre (durch Erhitzen weniger Iodkristalle) auf den Silicaplatten identifiziert werden. Ein Phytoene-Standard dient als Referenz. Die Menge an radioaktiv markiertem Produkt wird mittels Messung im Szintillationszähler bestimmt. Alternativ kann Phytoene auch mittels HPLC, die mit einem Radioaktivitätsdetektor versehen ist, quantifiziert werden (Fraser, Albrecht und Sandmann: Development of high performance liquid chromatographic systems for the separation of radiolabeled carotenes and precursors formed in specific enzymatic reactions; J. Chromatogr. 645 (1993) 265-272).

Unter Phytoen-Desaturase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Phytoen-Desaturase verstanden.

5 Unter einer Phytoen-Desaturase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Phytoen in Phytofluen und/oder Phytofluen in  $\zeta$ -Carotin (Zetacarotin) umzuwandeln.

10 Dementsprechend wird unter Phytoen-Desaturase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Desaturase umgesetzte Menge Phytoen bzw. Phytofluen bzw. gebildete Menge Phytofluen bzw.  $\zeta$ -Carotin verstanden.

15 Bei einer erhöhten Phytoen-Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Desaturase die umgesetzte Menge Phytoen bzw. Phytofluen bzw. die gebildete Menge Phytofluen bzw.  $\zeta$ -Carotin erhöht.

20 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Phytoen-Desaturase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Phytoen-Desaturase-Aktivität des Wildtyps.

25 Die Bestimmung der Phytoen-Desaturase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

30 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM  $KHCO_3$ . Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF  
35 zugegeben.

Die Aktivität der Phytoendesaturase (PDS) kann durch die Inkorporation von radioaktiv markiertem ( $^{14}\text{C}$ )-Phytoen in ungesättigte Carotine gemessen werden (nach Römer, Fraser, Kiano, Shipton, Misawa, Schuch und Bramley: Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants; *Nature Biotechnology* 18 (2000) 666-669). Radio-

5 aktiv markiertes Phytoene kann synthetisiert werden nach Fraser (Fraser, De la Rivas, Mackenzie, Bramley: *Phycomyces blakesleanus* CarB mutants: their use in assays of phytoene desaturase; *Phytochemistry* 30 (1991), 3971-3976). Membranen von Plastiden des Zielgewebes können mit 100 mM MES-Puffer (pH 6,0) mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$  und 1 mM Dithiothreitol in einem Gesamtvolumen von 1 mL inkubiert werden. In Aceton  
10 gelöstes ( $^{14}\text{C}$ )-Phytoen (etwa 100.000 Zerfälle/Minute für jeweils eine Inkubation) wird zugegeben, wobei die Acetonkonzentration 5 % (v/v) nicht übersteigen sollte. Diese Mischung wird bei 28°C für etwa 6 bis 7 Stunden im Dunklen unter Schütteln inkubiert. Danach werden Pigmente dreimal mit etwa 5 mL Petrolether (mit 10 % Diethylether versetzt) extrahiert und mittels HPLC getrennt und quantifiziert.

15

Alternativ kann die Aktivität der Phytoenedesaturase nach Fraser et al. (Fraser, Misawa, Linden, Yamano, Kobayashi und Sandmann: Expression in *Escherichia coli*, purification, and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase, *Journal of Biological Chemistry* 267 (1992), 19891-19895) gemessen werden.

20

Unter Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Zeta-Carotin-Desaturase verstanden.

25

Unter einer Zeta-Carotin-Desaturase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\zeta$ -Carotin in Neurosporin und/oder Neurosporin in Lycopin umzuwandeln.

30

Dementsprechend wird unter Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Zeta-Carotin-Desaturase umgesetzte Menge  $\zeta$ -Carotin oder Neurosporin bzw. gebildete Menge Neurosporin oder Lycopin verstanden.

35

Bei einer erhöhten Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Zeta-Carotin-Desaturase die umgesetzte Menge  $\zeta$ -Carotin oder Neurosporin bzw. die gebildete Menge Neurosporin oder Lycopin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Zeta-Carotin-Desaturase –  
5 Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

10

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten  
15 innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

20

Analysen zur Bestimmung der  $\xi$ -Carotin-Desaturase (ZDS-Desaturase) können in 0.2 M Kaliumphosphat (pH 7.8, Puffervolumen von etwa 1 ml) durchgeführt werden. Die Analyse  
25  $\xi$ -carotene desaturase from Capsicum annuum; European Journal of Biochemistry. 265(1):376-383, 1999 Oct ) publiziert. Jeder Analyseansatz enthält 3 mg Phosphatidylcholin, das in 0,4 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8) suspendiert ist, 5  $\mu$ g  $\xi$ -Carotin oder Neurosporene, 0,02 % Butylhydroxytoluol, 10  $\mu$ l Decyl-Plastochinon (1 mM methanolische Stammlösung) und Pflanzenextrakt. Das Volumen des Pflanzenextraktes muß der

30

Menge an vorhandener ZDS-Desaturase-Aktivität angepasst werden, um Quantifizierungen in einem linearen Messbereich zu ermöglichen. Inkubationen erfolgen typischerweise für etwa 17 Stunden bei kräftigem Schütteln (200 Umdrehungen/Minute) bei etwa 28°C im Dunklen. Carotinoide werden durch Zugabe von 4 ml Aceton bei 50°C für 10 Minuten unter Schütteln extrahiert. Aus dieser Mischung werden die Carotinoide in eine Petroletherphase (mit 10 % Diethylether) überführt. Die Dethy-  
35



lether/Petroletherphase wird unter Stickstoff evaporiert, die Carotinoide wieder in 20  $\mu$ l gelöst und mittels HPLC getrennt und quantifiziert.

Unter crtISO -Aktivität wird die Enzymaktivität eines crtISO-Proteins verstanden.

5

Unter einem crtISO-Proteins wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 7,9,7',9'-tetra-cis-Lycopin in all-trans-Lycopin umzuwandeln.

10

Dementsprechend wird unter crtISO-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein b-Cyclase umgesetzte Menge 7,9,7',9'-tetra-cis-Lycopin bzw. gebildete Menge all-trans-Lycopin verstanden.

15

Bei einer erhöhten crtISO-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das crtISO-Proteins die umgesetzte Menge 7,9,7',9'-tetra-cis-Lycopin bzw. die gebildete Menge all-trans-Lycopin erhöht.

20

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der crtISO-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der crtISO-Aktivität des Wildtyps.

25

Die Bestimmung der crtISO-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

30

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

35

Unter FtsZ-Aktivität wird die physiologische Aktivität eines FtsZ-Proteins verstanden.

Unter einem FtsZ-Protein wird ein Protein verstanden, das an der Zellteilungs und Plastidenteilungs fördernde Wirkung hat und Homologien zu Tubulinproteinen aufweist.

- 5 Unter MinD -Aktivität wird die physiologische Aktivität eines MinD -Proteins verstanden.

Unter einem MinD -Protein wird ein Protein verstanden, das eine multifunktionale Rolle bei der Zellteilung aufweist. Es ist eine Membran-assoziierte ATPase und kann innerhalb der Zelle eine oszillierende Bewegung von Pol zu Pol zeigen.

10

Weiterhin kann die Erhöhung der Aktivität von Enzymen des Nicht-Mevalonatweges zu einer weiteren Erhöhung des gewünschten Ketocarotenoid-Endproduktes führen. Beispiele hierfür sind die 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol-Synthase, die 4-

- 15 Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol-Kinase und die 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase. Durch Änderungen der Genexpression der entsprechenden Gene kann die Aktivität der genannten Enzyme erhöht werden. Die veränderten Konzentrationen der relevanten Proteine können standardgemäß mittels Antikörpern und entsprechenden Blotting-techniken nachgewiesen werden. Die Erhöhung der HMG-

- 20 CoA-Reduktase-Aktivität und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder Phytoen-Synthase-Aktivität und/oder Phytoen-

- 25 Desaturase-Aktivität und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität und/oder crtISO-Aktivität und/oder FtsZ-Aktivität und/oder MinD-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Ge-
- 35

ranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend ein crtISO-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein MinD-Protein gegenüber dem Wildtyp.

Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend ein crtISO-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein MinD-Protein gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des HMG-CoA-Reduktase-Gens und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gens und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gens und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Desaturase-Gens und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-Gens und/oder crtISO-Gens und/oder FtsZ-Gens und/oder MinD-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Kopien des HMG-CoA-Reduktase-Gens und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gens und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gens und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Desaturase-Gens und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-Gens und/oder crtISO-Gens und/oder FtsZ-Gens und/oder

MinD-Gens, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein crtISO-Protein und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein FtsZ-Protein und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein MinD-Protein in die Pflanze.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Phytoen-Synthase und/oder Phytoen-Desaturase und/oder Zeta-Carotin-Desaturase und/oder ein crtISO-Protein und/oder FtsZ-Protein und/oder MinD-Protein wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Pflanzen eigenen, endogenen HMG-CoA-Reduktase und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Phytoen-Synthase und/oder Phytoen-Desaturase und/oder Zeta-Carotin-Desaturase und/oder des Pflanzen eigenen crtISO-Proteins und/oder FtsZ-Proteins und/oder MinD-Proteins verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der entsprechenden Promotor DNA-Sequenz erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate

des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

- In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend ein crtISO-Protein und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend ein FtsZ-Protein und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend ein MinD-Protein durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder durch

- Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein crtISO-Protein und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein FtsZ-Protein und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein MinD-Protein in die Pflanze.

Dazu kann prinzipiell jedes HMG-CoA-Reduktase-Gen bzw. (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gen bzw. Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gen bzw. Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen bzw. Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gen bzw. Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen bzw. Phytoen-Synthase-Gen bzw. Phytoen-Desaturase-Gen bzw. Zeta-Carotin-Desaturase-Gen bzw. crtISO-Gen bzw. FtsZ-Gen bzw. MinD-Gen verwendet werden.

- Bei genomischen HMG-CoA-Reduktase-Sequenzen bzw. (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Sequenzen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Sequenzen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Sequenzen bzw. Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Sequenzen bzw. Geranyl-Diphosphat-Synthase-Sequenzen bzw. Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Sequenzen bzw. Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Sequenzen bzw. Phytoen-Synthase-Sequenzen bzw. Phytoen-Desaturase-Sequenzen bzw. Zeta-Carotin-Desaturase-Sequenzen bzw. crtISO-Sequenzen bzw. FtsZ-Sequenzen bzw. MinD-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Proteine zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

- In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres HMG-CoA-Reduktase-Gen und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gen und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gen und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gen und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gen und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gen und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen und/oder Phytoen-Synthase-Gen und/oder Phytoen-Desaturase-Gen und/oder

Zeta-Carotin-Desaturase-Gen und/oder crtISO-Gen und/oder FtsZ-Gen und/oder MinD-Gen vor.

- In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine HMG-CoA-Reduktase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Desaturase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend ein crtISO-Protein oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend ein crtISO-Protein und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend ein FtsZ-Protein oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend ein FtsZ-Protein und/oder mindestens eine exo-

gene Nukleinsäure, kodierend ein MinD-Protein oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend ein MinD-Protein auf.

Beispiele für HMG-CoA-Reduktase-Gene sind:

5

Eine Nukleinsäure, kodierend eine HMG-CoA-Reduktase aus *Arabidopsis thaliana*,  
Accession NM\_106299; (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 111, Protein: SEQ ID NO: 112),

sowie weitere HMG-CoA-Reduktase –Gene aus anderen Organismen mit den folgen-

10 den Accession Nummern:

P54961, P54870, P54868, P54869, O02734, P22791, P54873, P54871, P23228,  
P13704, P54872, Q01581, P17425, P54874, P54839, P14891, P34135, O64966,  
P29057, P48019, P48020, P12683, P43256, Q9XEL8, P34136, O64967, P29058,  
15 P48022, Q41437, P12684, Q00583, Q9XHL5, Q41438, Q9YAS4, O76819, O28538,  
Q9Y7D2, P54960, O51628, P48021, Q03163, P00347, P14773, Q12577, Q59468,  
P04035, O24594, P09610, Q58116, O26662, Q01237, Q01559, Q12649, O74164,  
O59469, P51639, Q10283, O08424, P20715, P13703, P13702, Q96UG4, Q8SQZ9,  
O15888, Q9TUM4, P93514, Q39628, P93081, P93080, Q944T9, Q40148, Q84MM0,  
20 Q84LS3, Q9Z9N4, Q9KLM0

Beispiele für (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene sind:

25

Eine Nukleinsäure, kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-  
Reduktase aus *Arabidopsis thaliana* (lytB/ISPH), ACCESSION AY168881, (Nuklein-  
säure: SEQ ID NO: 113, Protein: SEQ ID NO: 114),

sowie weitere (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase –Gene aus  
anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

30

T04781, AF270978\_1, NP\_485028.1, NP\_442089.1, NP\_681832.1, ZP\_00110421.1,  
ZP\_00071594.1, ZP\_00114706.1, ISPH\_SYNY3, ZP\_00114087.1, ZP\_00104269.1,  
AF398145\_1, AF398146\_1, AAD55762.1, AF514843\_1, NP\_622970.1, NP\_348471.1,  
NP\_562001.1, NP\_223698.1, NP\_781941.1, ZP\_00080042.1, NP\_859669.1,  
35 NP\_214191.1, ZP\_00086191.1, ISPH\_VIBCH, NP\_230334.1, NP\_742768.1,  
NP\_302306.1, ISPH\_MYCLE, NP\_602581.1, ZP\_00026966.1, NP\_520563.1,



NP\_253247.1, NP\_282047.1, ZP\_00038210.1, ZP\_00064913.1, CAA61555.1,  
 ZP\_00125365.1, ISPH\_ACICA, EAA24703.1, ZP\_00013067.1, ZP\_00029164.1,  
 NP\_790656.1, NP\_217899.1, NP\_641592.1, NP\_636532.1, NP\_719076.1,  
 NP\_660497.1, NP\_422155.1, NP\_715446.1, ZP\_00090692.1, NP\_759496.1,  
 5 ISPH\_BURPS, ZP\_00129657.1, NP\_215626.1, NP\_335584.1, ZP\_00135016.1,  
 NP\_789585.1, NP\_787770.1, NP\_769647.1, ZP\_00043336.1, NP\_242248.1,  
 ZP\_00008555.1, NP\_246603.1, ZP\_00030951.1, NP\_670994.1, NP\_404120.1,  
 NP\_540376.1, NP\_733653.1, NP\_697503.1, NP\_840730.1, NP\_274828.1,  
 NP\_796916.1, ZP\_00123390.1, NP\_824386.1, NP\_737689.1, ZP\_00021222.1,  
 10 NP\_757521.1, NP\_390395.1, ZP\_00133322.1, CAD76178.1, NP\_600249.1,  
 NP\_454660.1, NP\_712601.1, NP\_385018.1, NP\_751989.1

Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase -Gene sind:

15 Eine Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase aus *Lycopersicon esculentum*, ACCESSION #AF143812 (Nukleinsäure: SEQ ID NO:115 , Protein: SEQ ID NO: 116),

sowie weitere 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase –Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

20 AF143812\_1, DXS\_CAPAN, CAD22530.1, AF182286\_1, NP\_193291.1, T52289, AAC49368.1, AAP14353.1, D71420, DXS\_ORYSA, AF443590\_1, BAB02345.1, CAA09804.2, NP\_850620.1, CAD22155.2, AAM65798.1, NP\_566686.1, CAD22531.1, AAC33513.1, CAC08458.1, AAG10432.1, T08140, AAP14354.1, AF428463\_1,  
 25 ZP\_00010537.1, NP\_769291.1, AAK59424.1, NP\_107784.1, NP\_697464.1, NP\_540415.1, NP\_196699.1, NP\_384986.1, ZP\_00096461.1, ZP\_00013656.1, NP\_353769.1, BAA83576.1, ZP\_00005919.1, ZP\_00006273.1, NP\_420871.1, AAM48660.1, DXS\_RHOCA, ZP\_00045608.1, ZP\_00031686.1, NP\_841218.1, ZP\_00022174.1, ZP\_00086851.1, NP\_742690.1, NP\_520342.1, ZP\_00082120.1,  
 30 NP\_790545.1, ZP\_00125266.1, CAC17468.1, NP\_252733.1, ZP\_00092466.1, NP\_439591.1, NP\_414954.1, NP\_752465.1, NP\_622918.1, NP\_286162.1, NP\_836085.1, NP\_706308.1, ZP\_00081148.1, NP\_797065.1, NP\_213598.1, NP\_245469.1, ZP\_00075029.1, NP\_455016.1, NP\_230536.1, NP\_459417.1, NP\_274863.1, NP\_283402.1, NP\_759318.1, NP\_406652.1, DXS\_SYNLE,  
 35 DXS\_SYNP7, NP\_440409.1, ZP\_00067331.1, ZP\_00122853.1, NP\_717142.1,

ZP\_00104889.1, NP\_243645.1, NP\_681412.1, DXS\_SYNEL, NP\_637787.1,  
 DXS\_CHLTE, ZP\_00129863.1, NP\_661241.1, DXS\_XANCP, NP\_470738.1,  
 NP\_484643.1, ZP\_00108360.1, NP\_833890.1, NP\_846629.1, NP\_658213.1,  
 NP\_642879.1, ZP\_00039479.1, ZP\_00060584.1, ZP\_00041364.1, ZP\_00117779.1,  
 5 NP\_299528.1

Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene sind:

10 Eine Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase  
 aus *Arabidopsis thaliana*, ACCESSION #AF148852, (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 137 ,  
 Protein: SEQ ID NO: 138),

sowie weitere 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene aus anderen  
 Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

15 AF148852, AY084775, AY054682, AY050802, AY045634, AY081453, AY091405,  
 AY098952, AJ242588, AB009053, AY202991, NP\_201085.1, T52570, AF331705\_1,  
 BAB16915.1, AF367205\_1, AF250235\_1, CAC03581.1, CAD22156.1, AF182287\_1,  
 DXR\_MENPI, ZP\_00071219.1, NP\_488391.1, ZP\_00111307.1, DXR\_SYNLE,  
 20 AAP56260.1, NP\_681831.1, NP\_442113.1, ZP\_00115071.1, ZP\_00105106.1,  
 ZP\_00113484.1, NP\_833540.1, NP\_657789.1, NP\_661031.1, DXR\_BACHD,  
 NP\_833080.1, NP\_845693.1, NP\_562610.1, NP\_623020.1, NP\_810915.1,  
 NP\_243287.1, ZP\_00118743.1, NP\_464842.1, NP\_470690.1, ZP\_00082201.1,  
 NP\_781898.1, ZP\_00123667.1, NP\_348420.1, NP\_604221.1, ZP\_00053349.1,  
 25 ZP\_00064941.1, NP\_246927.1, NP\_389537.1, ZP\_00102576.1, NP\_519531.1,  
 AF124757\_19, DXR\_ZYMMO, NP\_713472.1, NP\_459225.1, NP\_454827.1,  
 ZP\_00045738.1, NP\_743754.1, DXR\_PSEPK, ZP\_00130352.1, NP\_702530.1,  
 NP\_841744.1, NP\_438967.1, AF514841\_1, NP\_706118.1, ZP\_00125845.1,  
 NP\_404661.1, NP\_285867.1, NP\_240064.1, NP\_414715.1, ZP\_00094058.1,  
 30 NP\_791365.1, ZP\_00012448.1, ZP\_00015132.1, ZP\_00091545.1, NP\_629822.1,  
 NP\_771495.1, NP\_798691.1, NP\_231885.1, NP\_252340.1, ZP\_00022353.1,  
 NP\_355549.1, NP\_420724.1, ZP\_00085169.1, EAA17616.1, NP\_273242.1,  
 NP\_219574.1, NP\_387094.1, NP\_296721.1, ZP\_00004209.1, NP\_823739.1,  
 NP\_282934.1, BAA77848.1, NP\_660577.1, NP\_760741.1, NP\_641750.1,

NP\_636741.1, NP\_829309.1, NP\_298338.1, NP\_444964.1, NP\_717246.1,  
NP\_224545.1, ZP\_00038451.1, DXR\_KITGR, NP\_778563.1.

Beispiele für Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gene sind:

5

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase aus Adonis  
palaestina clone ApIP128, (ipiAa1), ACCESSION #AF188060, veröffentlicht durch Cun-  
ningham,F.X. Jr. and Gantt,E.: Identification of multi-gene families encoding isopente-  
nyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in Escherichia  
10 coli, Plant Cell Physiol. 41 (1), 119-123 (2000) (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 117, Prote-  
in: SEQ ID NO: 118),

sowie weitere Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gene aus anderen Organismen  
mit den folgenden Accession Nummern:

15

Q38929, O48964, Q39472, Q13907, O35586, P58044, O42641, O35760, Q10132,  
P15496, Q9YB30, Q8YNH4, Q42553, O27997, P50740, O51627, O48965, Q8KFR5,  
Q39471, Q39664, Q9RVE2, Q01335, Q9HHE4, Q9BXS1, Q9KWF6, Q9CIF5,  
Q88WB6, Q92BX2, Q8Y7A5, Q8TT35 Q9KK75, Q8NN99, Q8XD58, Q8FE75,  
20 Q46822, Q9HP40, P72002, P26173, Q9Z5D3, Q8Z3X9, Q8ZM82, Q9X7Q6, O13504,  
Q9HFW8, Q8N9L9, Q9UUQ1, Q9NH02, Q9M6K9, Q9M6K5, Q9FXR6, O81691,  
Q9S7C4, Q8S3L8, Q9M592, Q9M6K3, Q9M6K7, Q9FV48, Q9LLB6, Q9AVJ1,  
Q9AVG8, Q9M6K6, Q9AVJ5, Q9M6K2, Q9AYS5, Q9M6K8, Q9AVG7, Q8S3L7,  
Q8W250, Q94IE1, Q9AVI8, Q9AYS6, Q9SAY0, Q9M6K4, Q8GVZ0, Q84RZ8,  
25 Q8KZ12, Q8KZ66, Q8FND7, Q88QC9, Q8BFZ6, BAC26382, CAD94476.

Beispiele für Geranyl-Diphosphat-Synthase -Gene sind:

30

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase aus Arabidopsis tha-  
liana, ACCESSION #Y17376, Bouvier,F., Suire,C., d'Harlingue,A., Backhaus,R.A. and  
Camara,B.; Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation  
of monoterpene synthesis in plant cells, Plant J. 24 (2), 241-252 (2000) (Nukleinsäure:  
SEQ ID NO: 119, Protein: SEQ ID NO: 120),

35

sowie weitere Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene aus anderen Organismen mit den  
folgenden Accession Nummern:

Q9FT89, Q8LKJ2, Q9FSW8, Q8LKJ3, Q9SBR3, Q9SBR4, Q9FET8, Q8LKJ1,  
Q84LG1, Q9JK86

Beispiele für Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene sind:

5

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* (FPS1), ACCESSION #U80605, veröffentlicht durch Cunillera,N., Arro,M., De-lourme,D., Karst,F., Boronat,A. und Ferrer,A.: *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes, J. Biol. Chem. 271 (13),

10 7774-7780 (1996), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 121, Protein: SEQ ID NO:122),

sowie weitere Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

15 P53799, P37268, Q02769, Q09152, P49351, O24241, Q43315, P49352, O24242,  
P49350, P08836, P14324, P49349, P08524, O66952, Q08291, P54383, Q45220,  
P57537, Q8K9A0, P22939, P45204, O66126, P55539, Q9SWH9, Q9AVI7, Q9FRX2,  
Q9AYS7, Q94IE8, Q9FXR9, Q9ZWF6, Q9FXR8, Q9AR37, O50009, Q94IE9, Q8RVK7,  
Q8RVQ7, O04882, Q93RA8, Q93RB0, Q93RB4, Q93RB5, Q93RB3, Q93RB1,  
20 Q93RB2, Q920E5.

Beispiele für Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase -Gene sind:

25 Eine Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase aus *Sinaps alba*, ACCESSION #X98795, veröffentlicht durch Bonk,M., Hoffmann,B., Von Lintig,J.,  
Schledz,M., Al-Babili,S., Hobeika,E., Kleinig,H. and Beyer,P.: Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes in vitro reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly, Eur. J. Biochem. 247 (3), 942-950 (1997), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 123, Protein: SEQ ID NO:124),

30

sowie weitere Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

35 P22873, P34802, P56966, P80042, Q42698, Q92236, O95749, Q9WTN0, Q50727,  
P24322, P39464, Q9FXR3, Q9AYN2, Q9FXR2, Q9AVG6, Q9FRW4, Q9SXZ5,  
Q9AVJ7, Q9AYN1, Q9AVJ4, Q9FXR7, Q8LSC5, Q9AVJ6, Q8LSC4, Q9AVJ3,

Q9SSU0, Q9SXZ6, Q9SST9, Q9AVJ0, Q9AVI9, Q9FRW3, Q9FXR5, Q94IF0,  
Q9FRX1, Q9K567, Q93RA9, Q93QX8, CAD95619, EAA31459

Beispiele für Phytoen-Synthase -Gene sind:

5

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Synthase aus *Erwinia uredovora*, ACCES-  
SION # D90087; veröffentlicht durch Misawa,N., Nakagawa,M., Kobayashi,K., Yama-  
no,S., Izawa,Y.,Nakamura,K. und Harashima,K.: Elucidation of the *Erwinia uredovora*  
carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in  
10 *Escherichia coli*; J. Bacteriol. 172 (12), 6704-6712 (1990), (Nukleinsäure: SEQ ID NO:  
125, Protein: SEQ ID NO: 126),

sowie weitere Phytoen-Synthase –Gene aus anderen Organismen mit den folgenden  
Accession Nummern:

15

CAB39693, BAC69364, AAF10440, CAA45350, BAA20384, AAM72615, BAC09112,  
CAA48922, P\_001091, CAB84588, AAF41518, CAA48155, AAD38051, AAF33237,  
AAG10427, AAA34187, BAB73532, CAC19567, AAM62787, CAA55391, AAB65697,  
AAM45379, CAC27383, AAA32836, AAK07735, BAA84763, P\_000205, AAB60314,  
20 P\_001163, P\_000718, AAB71428, AAA34153, AAK07734, CAA42969, CAD76176,  
CAA68575, P\_000130, P\_001142, CAA47625, CAA85775, BAC14416, CAA79957,  
BAC76563, P\_000242, P\_000551, AAL02001, AAK15621, CAB94795, AAA91951,  
P\_000448

25 Beispiele für Phytoen-Desaturase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Desaturase aus *Erwinia uredovora*, AC-  
CESSION # D90087; veröffentlicht durch Misawa,N., Nakagawa,M., Kobayashi,K.,  
Yamano,S., Izawa,Y.,Nakamura,K. und Harashima,K.: Elucidation of the *Erwinia ure-*  
30 *dovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products ex-  
pressed in *Escherichia coli*; J. Bacteriol. 172 (12), 6704-6712 (1990), (Nukleinsäure:  
SEQ ID NO: 127, Protein: SEQ ID NO: 128),

sowie weitere Phytoen-Desaturase –Gene aus anderen Organismen mit den folgenden

35 Accession Nummern:

AAL15300, A39597, CAA42573, AAK51545, BAB08179, CAA48195, BAB82461,  
 AAK92625, CAA55392, AAG10426, AAD02489, AAO24235, AAC12846, AAA99519,  
 AAL38046, CAA60479, CAA75094, ZP\_001041, ZP\_001163, CAA39004, CAA44452,  
 ZP\_001142, ZP\_000718, BAB82462, AAM45380, CAB56040, ZP\_001091, BAC09113,  
 5 AAP79175, AAL80005, AAM72642, AAM72043, ZP\_000745, ZP\_001141, BAC07889,  
 CAD55814, ZP\_001041, CAD27442, CAE00192, ZP\_001163, ZP\_000197, BAA18400,  
 AAG10425, ZP\_001119, AAF13698, 2121278A, AAB35386, AAD02462, BAB68552,  
 CAC85667, AAK51557, CAA12062, AAG51402, AAM63349, AAF85796, BAB74081,  
 AAA91161, CAB56041, AAC48983, AAG14399, CAB65434, BAB73487, ZP\_001117,  
 10 ZP\_000448, CAB39695, CAD76175, BAC69363, BAA17934, ZP\_000171, AAF65586,  
 ZP\_000748, BAC07074, ZP\_001133, CAA64853, BAB74484, ZP\_001156, AAF23289,  
 AAG28703, AAP09348, AAM71569, BAB69140, ZP\_000130, AAF41516, AAG18866,  
 CAD95940, NP\_656310, AAG10645, ZP\_000276, ZP\_000192, ZP\_000186,  
 AAM94364, EAA31371, ZP\_000612, BAC75676, AAF65582

15

Beispiele für Zeta-Carotin-Desaturase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase aus *Narcissus pseudonarcissus*,  
 ACCESSION #AJ224683, veröffentlicht durch Al-Babili, S., Oelschlegel, J. and  
 20 Beyer, P.: A cDNA encoding for beta carotene desaturase (Accession No. AJ224683)  
 from *Narcissus pseudonarcissus* L.. (PGR98-103), *Plant Physiol.* 117, 719-719 (1998),  
 (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 129, Protein: SEQ ID NO: 130),

sowie weitere Zeta-Carotin-Desaturase-Gene aus anderen Organismen mit den fol-  
 25 genden Accession Nummern:

Q9R6X4, Q38893, Q9SMJ3, Q9SE20, Q9ZTP4, O49901, P74306, Q9FV46, Q9RCT2,  
 ZDS\_NARPS, BAB68552.1, CAC85667.1, AF372617\_1, ZDS\_TARER, CAD55814.1,  
 CAD27442.1, 2121278A, ZDS\_CAPAN, ZDS\_LYCES, NP\_187138.1, AAM63349.1,  
 30 ZDS\_ARATH, AAA91161.1, ZDS\_MAIZE, AAG14399.1, NP\_441720.1, NP\_486422.1,  
 ZP\_00111920.1, CAB56041.1, ZP\_00074512.1, ZP\_00116357.1, NP\_681127.1,  
 ZP\_00114185.1, ZP\_00104126.1, CAB65434.1, NP\_662300.1

Beispiele für crtISO-Gene sind:

35

Eine Nukleinsäure, kodierend eine crtISO aus *Lycopersicon esculentum*; ACCESSION #AF416727, veröffentlicht durch Isaacson,T., Ronen,G., Zamir,D. and Hirschberg,J.: Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants; Plant Cell 14 (2), 333-342 (2002),  
 5 (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 131, Protein: SEQ ID NO:132),

sowie weitere crtISO –Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

10 AAM53952

Beispiele für FtsZ-Gene sind:

15 Eine Nukleinsäure, kodierend eine FtsZ aus *Tagetes erecta*, ACCESSION #AF251346, veröffentlicht durch Moehs,C.P., Tian,L., Osteryoung,K.W. and Dellapenna,D.: Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development Plant Mol. Biol. 45 (3), 281-293 (2001), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 133, Protein: SEQ ID NO: 134),

20 sowie weitere FtsZ –Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

CAB89286.1, AF205858\_1, NP\_200339.1, CAB89287.1, CAB41987.1, AAA82068.1, T06774,AF383876\_1, BAC57986.1, CAD22047.1, BAB91150.1, ZP\_00072546.1,  
 25 NP\_440816.1, T51092, NP\_683172.1, BAA85116.1, NP\_487898.1, JC4289, BAA82871.1, NP\_781763.1, BAC57987.1, ZP\_00111461.1, T51088, NP\_190843.1, ZP\_00060035.1, NP\_846285.1, AAL07180.1, NP\_243424.1, NP\_833626.1, AAN04561.1, AAN04557.1, CAD22048.1, T51089, NP\_692394.1, NP\_623237.1, NP\_565839.1, T51090, CAA07676.1, NP\_113397.1, T51087, CAC44257.1, E84778, ZP\_00105267.1, BAA82091.1, ZP\_00112790.1, BAA96782.1, NP\_348319.1,  
 30 NP\_471472.1, ZP\_00115870.1, NP\_465556.1, NP\_389412.1, BAA82090.1, NP\_562681.1, AAM22891.1, NP\_371710.1, NP\_764416.1, CAB95028.1, FTSZ\_STRGR, AF120117\_1, NP\_827300.1, JE0282, NP\_626341.1, AAC45639.1, NP\_785689.1, NP\_336679.1, NP\_738660.1, ZP\_00057764.1, AAC32265.1,  
 35 NP\_814733.1, FTSZ\_MYCKA, NP\_216666.1, CAA75616.1, NP\_301700.1, NP\_601357.1, ZP\_00046269.1, CAA70158.1, ZP\_00037834.1, NP\_268026.1,

FTSZ\_ENTHR, NP\_787643.1, NP\_346105.1, AAC32264.1, JC5548, AAC95440.1, NP\_710793.1, NP\_687509.1, NP\_269594.1, AAC32266.1, NP\_720988.1, NP\_657875.1, ZP\_00094865.1, ZP\_00080499.1, ZP\_00043589.1, JC7087, NP\_660559.1, AAC46069.1, AF179611\_14, AAC44223.1, NP\_404201.1.

5

Beispiele für MinD -Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine MinD aus *Tagetes erecta*, ACCESSION #AF251019, veröffentlicht durch Moebs,C.P., Tian,L., Osteryoung,K.W. und Dellapenna,D.: Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development; Plant Mol. Biol. 45 (3), 281-293 (2001), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 135, Protein: SEQ ID NO: 136),

sowie weitere MinD –Gene mit den folgenden Accession Nummern:

15

NP\_197790.1, BAA90628.1, NP\_038435.1, NP\_045875.1, AAN33031.1, NP\_050910.1, CAB53105.1, NP\_050687.1, NP\_682807.1, NP\_487496.1, ZP\_00111708.1, ZP\_00071109.1, NP\_442592.1, NP\_603083.1, NP\_782631.1, ZP\_00097367.1, ZP\_00104319.1, NP\_294476.1, NP\_622555.1, NP\_563054.1, NP\_347881.1, ZP\_00113908.1, NP\_834154.1, NP\_658480.1, ZP\_00059858.1, NP\_470915.1, NP\_243893.1, NP\_465069.1, ZP\_00116155.1, NP\_390677.1, NP\_692970.1, NP\_298610.1, NP\_207129.1, ZP\_00038874.1, NP\_778791.1, NP\_223033.1, NP\_641561.1, NP\_636499.1, ZP\_00088714.1, NP\_213595.1, NP\_743889.1, NP\_231594.1, ZP\_00085067.1, NP\_797252.1, ZP\_00136593.1,

25

NP\_251934.1, NP\_405629.1, NP\_759144.1, ZP\_00102939.1, NP\_793645.1, NP\_699517.1, NP\_460771.1, NP\_860754.1, NP\_456322.1, NP\_718163.1, NP\_229666.1, NP\_357356.1, NP\_541904.1, NP\_287414.1, NP\_660660.1, ZP\_00128273.1, NP\_103411.1, NP\_785789.1, NP\_715361.1, AF149810\_1, NP\_841854.1, NP\_437893.1, ZP\_00022726.1, EAA24844.1, ZP\_00029547.1,

30

NP\_521484.1, NP\_240148.1, NP\_770852.1, AF345908\_2, NP\_777923.1, ZP\_00048879.1, NP\_579340.1, NP\_143455.1, NP\_126254.1, NP\_142573.1, NP\_613505.1, NP\_127112.1, NP\_712786.1, NP\_578214.1, NP\_069530.1, NP\_247526.1, AAA85593.1, NP\_212403.1, NP\_782258.1, ZP\_00058694.1, NP\_247137.1, NP\_219149.1, NP\_276946.1, NP\_614522.1, ZP\_00019288.1,

35

CAD78330.1



Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als HMG-CoA-Reduktase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 112 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 112, und die die enzymatische Eigenschaft einer HMG-CoA-Reduktase aufweisen.

10 Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und HMG-CoA-Reduktase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 112 leicht auffinden.

15 Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und HMG-CoA-Reduktase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 111 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise  
20 leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der HMG-CoA-Reduktase der Sequenz  
25 SEQ ID NO: 112.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

30 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

35 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 111 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 114 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 114, und die die enzymatische Eigenschaft einer (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-

10 Reduktase aufweisen.

Weitere Beispiele für (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktasen und (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 114 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktasen und (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 113 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

25

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase der Sequenz SEQ ID NO: 114.

30

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand

35

von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 113 in den Organismus ein.

10 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 116 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 116, und die die enzymatische Eigenschaft einer (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase aufweisen.

15 Weitere Beispiele für (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthasen und (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 116 leicht auffinden.

25 Weitere Beispiele für (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthasen und (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 115 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

30 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 116.

35 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 115 in den Organismus ein.

10

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 138 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 138, und die die enzymatische Eigenschaft einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase aufweisen.

15

Weitere Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerasen und 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 138 leicht auffinden.

20

Weitere Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerasen und 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 137 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

25

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase der Sequenz SEQ ID NO: 138.

30

35

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 137 in den Organismus ein.

15 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Isopentenyl-D-Isomerase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 118 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 118, und die die enzymatische Eigenschaft einer Isopentenyl-D-Isomerase aufweisen.

20 Weitere Beispiele für Isopentenyl-D-Isomerasen und Isopentenyl-D-Isomerase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 118 leicht auffinden.

30 Weitere Beispiele für Isopentenyl-D-Isomerasen und Isopentenyl-D-Isomerase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 117 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

35 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Isopentenyl-D-Isomerase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Isopentenyl-D-Isomerase der Sequenz SEQ ID NO: 118.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 117 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 120 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 120, und die die enzymatische Eigenschaft einer Geranyl-Diphosphat-Synthase aufweisen.

Weitere Beispiele für Geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 120 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 119 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Geranyl-Diphosphat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 120.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 119 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 122 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 122, und die die enzymatische Eigenschaft einer Farnesyl-Diphosphat-Synthase aufweisen.

Weitere Beispiele für Farnesyl-Diphosphat-Synthasen und Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 122 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Farnesyl-Diphosphat-Synthasen und Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 121 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Farnesyl-Diphosphat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 122.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 121 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 124 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 124, und die die enzymatische Eigenschaft einer Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase aufweisen.

Weitere Beispiele für Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 124 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 123 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen einge-



bracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 124.

5 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

10 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 123 in den Organismus ein.

15 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Phytoen-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 126 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Amino-

20 säureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 126, und die die enzymatische Eigenschaft einer Phytoen-Synthase aufweisen.

25 Weitere Beispiele für Phytoen-Synthasen und Phytoen-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 126 leicht auffinden.

30 Weitere Beispiele für Phytoen-Synthasen und Phytoen-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 125 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Phytoen-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Phytoen-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 126.

5

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

10

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

15

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 125 in den Organismus ein.

20

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Phytoen-Desaturase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 128 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 128, und die die enzymatische Eigenschaft einer Phytoen-Desaturase aufweisen.

25

Weitere Beispiele für Phytoen-Desaturasen und Phytoen-Desaturase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SeQ ID NO: 128 leicht auffinden.

30

Weitere Beispiele für Phytoen-Desaturasen und Phytoen-Desaturase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 127 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

35

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Phytoen-Desaturase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Phytoen-Desaturase der Sequenz SEQ ID NO: 128.

5

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

10 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 127 in den Organismus ein.

20 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Zeta-Carotin-Desaturase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 130 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 130, und die die enzymatische Eigenschaft einer Zeta-Carotin-Desaturase aufweisen.

25

Weitere Beispiele für Zeta-Carotin-Desaturasen und Zeta-Carotin-Desaturase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 130 leicht auffinden.

30

Weitere Beispiele für Zeta-Carotin-Desaturasen und Zeta-Carotin-Desaturase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 129 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

35

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Zeta-Carotin-Desaturase der Sequenz SEQ ID NO: 130.

5

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

10

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

15

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 129 in den Organismus ein.

20

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als CrtIso-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 132 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 132, und die die enzymatische Eigenschaft einer CrtIso aufweisen.

25

Weitere Beispiele für CrtIson und CrtIso-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq

30

ID NO: 132 leicht auffinden.

35

Weitere Beispiele für CrtIson und CrtIso-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 131 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der CrtIso-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der CrtIso der Sequenz SEQ ID NO: 132.

- 5 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand  
10 von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 131 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als FtsZ-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 134 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens  
20 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 134, und die die enzymatische Eigenschaft einer FtsZ aufweisen.

25 Weitere Beispiele für FtsZn und FtsZ-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 134 leicht auffinden.

30 Weitere Beispiele für FtsZn und FtsZ-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 133 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

35

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der FtsZ-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der FtsZ der Sequenz SEQ ID NO: 134

- 5 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand  
10 von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 133 in den Organismus ein.

15

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als MinD-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 136 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens  
20 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 136, und die die enzymatische Eigenschaft einer MinD aufweisen.

25 Weitere Beispiele für MinDn und MinD-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 136 leicht auffinden.

30

Weitere Beispiele für MinDn und MinD-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 135 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

35

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der MinD-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der MinD der Sequenz SEQ ID NO: 136.

- 5 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand  
10 von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 135 in den Organismus ein.

15

Alle vorstehend erwähnten HMG-CoA-Reduktase-Gene, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gene, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene, Farnesyl-Diphosphat-  
20 Synthase-Gene, Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene, Phytoen-Synthase-Gene, Phytoen-Desaturase-Gene, Zeta-Carotin-Desaturase-Gene, crtISO-Gene, FtsZ-Gene oder MinD-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in  
25 bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook  
30 et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

35

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität auf.

Unter einer reduzierten Aktivität wird, wie vorstehend erwähnt, vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität eines Enzyms in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

Die Reduzierung einer Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der Proteinmenge, oder der mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung der Proteinmenge oder der mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

Eine Reduzierung einer Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung eines Proteins bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des Proteins (d.h. fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des entsprechenden Proteins).

Unter endogener  $\beta$ -Hydroxylase –Aktivität wird die Enzymaktivität der endogenen, pflanzeneigenen  $\beta$ -Hydroxylase verstanden.

Unter einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase wird eine endogene, pflanzeneigene Hydroxylase wie vorstehend beschrieben, verstanden. Ist beispielsweise *Tagetes erecta* die genetisch zu verändernde Zielpflanze, so wird unter der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase die  $\beta$ -Hydroxylase von *Tagetes erecta* verstanden.

Unter einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase wird demnach insbesondere ein pflanzeneigenes Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter endogener  $\beta$ -Hydroxylase –Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein endogene  $\beta$ -Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin verstanden.

Bei einer reduzierten endogenen  $\beta$ -Hydroxylase–Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die durch das Protein endo-



gene  $\beta$ -Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin reduziert.

5 Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %. Besonders bevorzugt ist die endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

10 Es wurde überraschenderweise gefunden, dass es bei Pflanzen die mehrheitlich Carotinoide des  $\alpha$ -Carotin-Weges, wie beispielsweise Lutein, herstellen, wie beispielsweise Pflanzen der Gattung Tagetes, vorteilhaft ist, die Aktivität der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase zu reduzieren und gegebenenfalls die Aktivität einer heterologen Hydroxylase zu erhöhen. Besonders bevorzugt werden dabei Hydroxylasen oder funktionelle Äquivalente davon verwendet, die aus Pflanzen stammen, die mehrheitlich Carotinoide  
15 des  $\beta$ -Carotin-Weges herstellen, wie beispielsweise die vorstehend beschriebene  $\beta$ -Hydroxylase aus Tomate (Nukleinsäure: SEQ ID No. 107, Protein: SEQ ID No. 108).

Die Bestimmung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität erfolgt wie vorstehend beschrieben analog zur Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität.

20

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

25

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten.

30

Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA gegen ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,

35

- b) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch endogene  $\beta$ -Hydroxylase-

antisenseRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-antisenseRNA gegen ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuresequenzen,

- c) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- d) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch endogene  $\beta$ -Hydroxylase-senseRNA genannt, zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- f) Einbringen mindestens einer, den endogenen  $\beta$ -Hydroxylase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Gensequenzen generiert werden.

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase bzw. seiner Aktivität oder

Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder

- 5 Aktivität einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase, des Transports der Zeaxanthin-Epoxidase und/oder endogenen  $\beta$ -Hydroxylase oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung
- 10 der Translationselongation oder -termination umfassen.

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

15

- a) Einbringen einer doppelsträngigen, endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz (endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA)

20

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA wurde vorstehend für die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität ausführlich beschrieben. Analog lässt sich dieses Verfahren für die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität durchführen.

25

Unter einer doppelsträngigen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

30

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

5

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder

10

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist.

15

Unter dem Begriff „endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Transkript“ wird der transkripierte Teil eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens verstanden, der neben der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

20

Unter einer RNA, die „mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist“, ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

25

Unter „einem Teil“ des Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

30

In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA Teile des endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Transkripts und/oder Teilsequenzen der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil des Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine endogene  $\beta$ -Hydroxylase enthält. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase bewirken.

Ferner betrifft die Erfindung ein doppelsträngiges RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase (endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA) umfassend dabei bevorzugt

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA-endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

30

Zur Transformation der Pflanze mit einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA transkribiert wird.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

- 5 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-endogene  $\beta$ -Hydroxylase Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

10

Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

15

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 139 oder ein Teil derselben verstanden.

20

"Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens, bzw. zwischen dem

25 "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens.

30

Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Sequenz des einen Organismus generiert wurde,

35 die endogene  $\beta$ -Hydroxylase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrü-

cken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

- 5 Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).
- 10 "Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.
- 15

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA

- 20 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

25

Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

- 30 a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens, und
- b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

Zur Herstellung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Sequenzen zur Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

- 5 SEQ ID NO: 141: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase

SEQ ID NO: 142: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase

10

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

15

Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

20

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären

25

dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

30

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

35

Weitere bevorzugte Ausführungsformen für die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität ergeben sich analog der vorstehend beschriebenen, bevorzugten



Ausführungsformen der Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität unter Austausch der  $\epsilon$ -Cyclase durch endogene  $\beta$ -Hydroxylase.

Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte

5 Pflanzen mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

Genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

10

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

15

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

20

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

25

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

30

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen, sowie

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

- 5 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- 10 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- 15 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- 20 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

- 25 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- 5 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- 10 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

- 15 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- 20 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen.

- 25 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- 30 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- 35 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-

Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Ak-

tivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte b-Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte b-Cyclase-Aktivität, eine reduzierte endogene b-Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte b-Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte e-Cyclase-Aktivität, eine erhöhte b-Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte e-Cyclase-Aktivität, eine erhöhte b-Cyclase-Aktivität, eine reduzierte endogene b-Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen, weisen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität auf, wobei

die erhöhte Ketolase Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist,

die erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäure einbringt, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 110 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 110 aufweist

und die erhöhte Hydroxylase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, kodierend eine Hydroxylase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 108 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 108 aufweist.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen, weisen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\varepsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität auf, wobei

die erhöhte Ketolase Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist,

die erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäure einbringt, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 110 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 100 aufweist,

die erhöhte Hydroxylase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, kodierend eine Hydroxylase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 108 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 108 aufweist, und die reduzierte  $\varepsilon$ -Cyclase-

Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität gemäß den vorstehend beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen verursacht wird.

- 5 Die Herstellung dieser genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei, drei oder vier der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

- 10 Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität in Blütenblättern beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und/oder der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und/oder der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität und/oder der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität und/oder der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-
- 15 Reduktoisomerase-Aktivität und/oder der Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität und/oder der Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder der Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder der Phytoen-Synthase-Aktivität und/oder der Phytoen-Desaturase-Aktivität und/oder der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität und/oder der crtISO-Aktivität
- 20 und/oder der FtsZ-Aktivität und/oder der MinD-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase bzw. Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-
- 25 Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend ein crtISO-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein MinD-Protein anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Reduzierung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise die
- 30 Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität bzw. der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität kann
- 35



analog unter Verwendung von anti- $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenzen oder  $\epsilon$ -Cyclase-Inverted-Repeat-Nukleinsäuresequenz bzw. unter Verwendung von anti-endogenen b-Hydroxylase-Nukleinsäuresequenzen oder endogenen b-Hydroxylase-Inverted-Repeat-Nukleinsäuresequenzen anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase  
5 erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen der Gattung Tagetes erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die  
10 vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.  
15

Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die  
20 die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette  
25 stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart,  
30 das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen der Gattung Tagetes und Verfahren zur Her-  
35

stellung von transgenen Pflanzen der Gattung *Tagetes*, sowie die transgenen Pflanzen der Gattung *Tagetes* selbst beschrieben.

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

"Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).

Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus *Agrobacterium*, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus *Agrobacterium*, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolären ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hille-

brand et al. (1996), *Gene*, 170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) *Plant J* 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) *Neth J Plant Pathol* 89:245-254; Uknes, et al. (1992) *The Plant Cell* 4:645-656; Van Loon (1985) *Plant Mol Biol* 4:111-116; Marineau et al. (1987) *Plant Mol Biol* 9:335-342; Matton et al. (1987) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-342; Somssich et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) *Mol Gen Genetics* 2:93-98; Chen et al. (1996) *Plant J* 10:955-966; Zhang and Sing (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) *Plant J* 3:191-201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961-968(1989).

Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) *Ann Rev Phytopath* 28:425-449; Duan et al. (1996) *Nat Biotech* 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al.

(1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

5

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß

10

entwicklungsabhängig erfolgt.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise

15

Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

20

Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel

25

(Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).  
Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder der AP3 Promoter aus Arabidopsis thaliana (siehe Beispiel 1).

30

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

35

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der Ketolase in Blütenblättern der erfindungsgemäßen Pflanzen.

5 Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz  
10 inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene  
15 Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

20 Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für  
25 die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als  
30 auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-  
35 Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

## pTP09

5 KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC  
GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-  
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-  
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGC-  
GATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGG-  
GATCC\_BamHI

10

## pTP10

15 KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC  
GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-  
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-  
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGC-  
GATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGCTG-  
GATCC\_BamHI

## 20 pTP11

25 KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC  
GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-  
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-  
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGC-  
GATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGGG-  
GATCC\_BamHI

30 Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidä-  
ren Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das  
Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus  
Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cas-  
sette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

35 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich  
gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-

Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

- 5 Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen der Gattung *Tagetes* bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

- 10 Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptern oder Linker angesetzt werden.

- 15 Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger  
20 als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche  
25 sind gegeneinander beliebig austauschbar.

- Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) *Nucl Acids Res.* 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequen-  
30 ce. *J Mol Appl Genet.* 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J.* 3: 835-846).

- 35 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt wer-

den. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

- 5 Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

- 10 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

- 15 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen

- 20 Transformation genutzt werden.

- Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 beschrieben.
- 25
- 30

- Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).
- 35



Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

5

Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN2 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden Mit

10

einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

15

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase enthalten.

20

Zur Transformation einer Wirtspflanze der Gattung Tagetes mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

25

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res.16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

30  
35

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression konstitutiv oder vorzugsweise spezifisch in den Blütenblättern erfolgen.

Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* weisen  
5 im Vergleich zum Wildtyp einen Gehalt an Astaxanthin, insbesondere in Petalen auf.

Wie vorstehend erwähnt, betrifft die Erfindung die Verwendung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltiger Extrakte von  
10 astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur oralen Verabreichung an Tiere.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von  
15 astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet.

Unter astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen werden bevorzugt Lösungen, enthaltend Astaxanthin verstanden, die durch Extraktion aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen mit mindestens einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt wurden. Je nach verwendetem Lösungsmittel und verwendeten weiteren chemischen und physikalischen Reinigungsverfahren kann das  
20 Astaxanthin in beliebigen Reinheitsgraden im Extrakt vorliegen. Es ist vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile vor Extraktion entsprechend aufzubereiten, beispielsweise die Pflanzen oder Pflanzenteile zu trocknen und zu zerkleinern, wobei die Reihenfolge beliebig ist.  
25

Astaxanthin kann aus den astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen, die gegebenenfalls vorher getrocknet und/oder zerkleinert wurden durch organische Lösungsmittel extrahiert werden, wie beispielsweise durch Aceton, Hexan, Methylenchlorid,  
30 Methyl-tertiär-Butyl-ether oder durch Lösungsmittelgemische wie Ethanol/Hexan oder Aceton/Hexan. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der Lösungsmittel kann aufgrund der verschiedenen Polarität die Extraktionswirkung variiert werden. Durch eine solche Extraktion lässt sich Astaxanthin mit hoher Konzentration anreichern.

35 Anschließend kann durch Ausschütteln von Astaxanthin und chromatografische Auftrennung des Gemisches die Reinheit von Astaxanthin weiter erhöht werden. Asta-

xanthin liegt in der Regel als Gemisch aus Mono- und Diestern vor, meist als Ester der Palmitinsäure.

5 Unter „Pigmentierung“ wird erfindungsgemäß vorzugsweise die Intensivierung oder Verursachung einer Farbe zumindest eines Teils eines Tieres oder Tierproduktes des pigmentierten Tieres im Vergleich zum nicht pigmentierten Tier verstanden. Astaxanthinhaltige Pigmentierstoffe pigmentieren und verursachen oder intensivieren in der Regel einen rosa bis rosa-roten Farbton.

10 Bevorzugte Tiere die durch die erfindungsgemäße orale Verabreichung pigmentiert werden können sind Tiere, ausgewählt aus der Gruppe Fische, Crustaceae oder Vögel, insbesondere Galliformes und Anatridae.

Bevorzugte Fische sind Salmoniden, insbesondere Lachs oder Forelle.

15

Bevorzugte Crustaceae sind Shrimps oder Krebse.

Bevorzugte Galliformes sind Hühner, Enten oder Gänse.

20 Bevorzugter Anatridae ist Flamingo.

Je nach pigmentiertem Tier werden vorzugsweise unter pigmentierten Tierprodukten insbesondere Fleisch für Lachs oder Forelle, Haut für Hühner, Enten oder Gänse, Feder für Hühner, Enten, Gänse oder Flamingo und Ei bzw. Eidotter für Hühner, Enten oder Gänse verstanden.

25

Die orale Verabreichung der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere kann direkt erfolgen oder über orale Verabreichung von Tierfutterzubereitungen, denen zuvor die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes beigemischt wurden.

30

35 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von asta-

xanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht.

5 Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form zu prozessieren, die eine Beimischung zu entsprechenden Tierfutterzubereitung ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Bioverfügbarkeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbereich führt.

10 Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfutterzubereitung können dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.

15 Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungsform vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile, insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Besonders bevorzugt liegen die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.

20 Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen beigemischt werden.

25 Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft.

30 Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt der Tierfutterzubereitung beigemischt werden.

Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthinhaltigen Pulver oder Ölen eingesetzt werden.

35 Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl

oder geriebene Tagetespetalen, aufgebracht werden, oder in Alginat, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in  
5 flüssiger oder pulverisierter Form vor.

Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte  
astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert  
oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen bei-  
10 gemischt werden.

Der Erfindung betrifft daher auch Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhalti-  
ge Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Ex-  
trakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

15 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen  
durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gat-  
tung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen  
oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfuttermitteln.

20 Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass  
die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die  
astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der  
Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozes-  
25 siert werden, die ein Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln ermöglicht.

Beispielsweise für Fische können die Fischfutterzubereitungen weitere übliche Fisch-  
futterkomponenten enthalten, wie beispielsweise Fischmehl und/oder andere Proteine,  
Öle, wie beispielsweise Fischöle, Getreide, Vitamine, Mineralien, Konservierungsstoffe  
30 und gegebenenfalls Medikamente in üblichen Mengen.

Eine typische Fischfutterrezeptur für Forellen setzt sich beispielsweise aus folgenden  
Komponenten zusammen:

<b>Komponenten</b>	<b>Gew.-%</b>	<b>Einwaage f. 500 kg</b>
		<b>kg</b>
Fischmehl	30,00	150,00
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00
Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

Eine typische Fischfutterrezeptur für Lachse setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:

<b>Komponenten</b>	<b>Gew.-%</b>
Fischmehl	75,00
Pflanzliches Protein	5,00
Getreide	7,80
Vitamine/Mineralien	1,00
Antioxidan- tien/Konservierungsstoffe	0,20
Fischöl	11,00

5

In einer Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in getrockneter und zerkleinerter Pulverform beigemischt.

- 10 Die so erhaltenen Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, können bei Fischfutter bei-

spielsweise in an sich bekannter Weise pelletiert oder besonders vorteilhaft extrudiert werden.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Extrakte den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in flüssiger Form beigemischt. Dies ist insbesondere vorteilhaft bei der Herstellung von extrudierten Fischfutterzubereitungen. Der Extrusionsprozess führt zu Extrusionsstress auf die empfindliche Stoffe, wie beispielsweise Astaxanthin, der zu einem Astaxanthinverlust führen kann. Bei Extrusionsstress handelt es sich primär um die Einwirkung mechanische Kräfte (Kneten, Scherung, 10 Druck, etc.) jedoch auch um hydrothermischen Stress, verursacht durch Wasser- und Wasserdampfzugaben, auch oxidativer Stress ist zu beobachten.

15 Um die durch den oben beschriebenen Extrusionsprozess auftretenden Astaxanthinverluste zu vermeiden, können flüssige astaxanthinhaltige Extrakte durch die sogenannte PPA-Technik nach dem Extrusions - und Trocknungsprozess unter Vakuum appliziert werden (*post pelleting application*).

20 In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht.

25 Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form zu prozessieren, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Bioverfügbarkeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbereich führt.

30 Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfutterzubereitung können dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.

35 Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungsform vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile, insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Beson-

ders bevorzugt liegen die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.

5 Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise oral an Tiere verabreicht werden.

10 Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft.

15 Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt oral an Tiere verabreicht werden.

Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthinhaltigen Pulver oder Ölen verabreicht werden.

20 Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl oder geriebene Tagetespetalen, aufgebracht werden, oder in Alginate, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

25 Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in flüssiger oder pulverisierter Form vor.

30 Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise oral an Tiere verabreicht werden.

35 Der Erfindung betrifft daher auch Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthin-



haltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform bestehen die Pigmentiermittel aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie vorstehend beschrieben prozessiert sein  
10 können.

Bei besonders bevorzugten Pigmentiermitteln verwendet man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen.

15 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

20 Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch oralen Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

25 Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.

30 Die Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bzw. Tierfuttermittel enthaltend diese Pigmentiermittel weisen weiterhin den Vorteil einer hohen Lagerstabilität und Bioverfügbarkeit des Pigments Astaxanthin auf.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Beispiel I

- 5 Herstellung astaxanthinhaltiger, genetisch veränderter Pflanzen der Gattung *Tagetes*

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:  
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

- 10 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel I.1:

- 15 Amplifikation einer cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille codiert

- 20 Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert.

- Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*-Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.02 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l FeSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.
- 25  
30  
35

Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60\_C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) in cDNA umgeschrieben.

5

Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

10

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

15

- 4 ml einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 20 - 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

25 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94\_C 2 Minuten
- 35X 94\_C 1 Minute
- 53\_C 2 Minuten
- 30 72\_C 3 Minuten
- 1X 72\_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 30 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert (SEQ ID NO: 22). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Ampli-

35

fikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (Abbildung 1 und 2, Sequenzvergleiche).

Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SpHI-Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung in den SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJKETO2.

#### Beispiel 1.2:

Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em.

Wille mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-terminus codiert

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* Suspensionskultur (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") amplifiziert.

Die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 beschrieben.

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR3 SEQ ID NO: 31) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem

5 enthalten war:

- 4 ml einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 10 - 0.2 mM PR3 (SEQ ID NO: 31)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

15

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	2 Minuten
	72_C	3 Minuten

20

1X	72_C 1	0 Minuten
----	--------	-----------

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 31 resultierte in einem 1111 Bp Fragment, das für ein Ketolase Protein codiert, bei dem N-terminalen Aminosäuren (Position 2-16) durch eine einzige Aminosäure (Leucin) ersetzt sind.

25

Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 5'Region (Position 1-53) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 24

30 durch eine in der Sequenz abweichende Nonamersequenz ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

35

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 985 Bp SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-

Terminus in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO3.

Beispiel I.3:

- 5 Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert.
- 10 Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmids pGKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) und des Primers PR15 (SEQ ID NO: 32) hergestellt. Der Primer PR15 setzt sich zusammen aus einer antisense spezifischen 3'Region (Nucleotide 40 bis 59) und
- 15 einer myc-Tag codierenden 5'Region (Nucleotide 1 bis 39).

Die Denaturierung (5 min bei 95\_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40\_C) von pGKETO2 und PR15 erfolgte in einem 11.5 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 20
- 1 mg pGKETO2 PlasmidDNA
- 0.1 mg PR15 (SEQ ID NO: 32)

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30\_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 25
- 11.5 ml pGKETO2/PR15-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 30 - 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines

- 35 antisense spezifischen Primers (PR15 SEQ ID NO: 32) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 10 - 0.2 mM PR15 (SEQ ID NO: 32)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

15

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
20	53_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO:32 und SEQ ID NO:30 resultierte in einem 1032 Bp-Fragment, das für ein Protein codiert, bestehend aus der gesamten Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als zweifache translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptide am N-Terminus und dem myc-Tag am C-Terminus.

Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 3'Region (Position 993 bis 1155) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 26 durch eine in der abweichende Sequenz aus 39 Bp ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

35

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1038 Bp EcoRI-SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem EcoRI-SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Durch die Ligation entsteht eine translationale Fusion zwischen dem C-Terminus der rbcS Transitpeptidsequenz und dem N-Terminus der Ketolase Sequenz. Der Klon, der die

5 *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag in der korrekten Orientierung als translationale N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO4.

Beispiel I.4:

- 10 Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. PCC 7120* codiert

Die DNA, die für die Ketolase aus *Nostoc PCC 7120* kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc PCC 7120* (Stamm der "Pasteur Culture Collection of Cyanobacterium") amplifiziert.

15

Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc PCC 7120*, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.075 g/l MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1ml trace metal mix A5+Co (2.86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.39 g/l NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

20

25

Protokoll für DNA Isolation aus *Nostoc PCC7120*:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei

30 8 000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von



100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

- 10 Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc PCC 7120*, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc PCC 7120* unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NOSTF, SEQ ID No. 87) und eines antisense-spezifischen Primers (NOSTG, SEQ ID NO. 88) amplifiziert.

- 15 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

20

- 1 µl einer *Nostoc PCC 7120* DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM NOSTF (SEQ ID No. 87)
  - 0.2 mM NOSTG (SEQ ID No. 88)
- 25
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
  - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
  - 25.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	55°C	1 Minuten
	72°C	3 Minuten
35	1X 72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 87 und SEQ ID No. 88 resultierte in einem 805 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 89). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert und der Klon pNOSTF-G erhalten.

Sequenzierung des Klons pNOSTF-G mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz des Datenbankeintrages AP003592 identisch ist. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc PCC 7120*.

Dieser Klon pNOSTF-G wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SphI-Fragmentes aus pGEM-T und Ligation in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Ketolase von *Nostoc* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJNOST.

#### Beispiel I.5:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters d35S aus CaMV (Franck et al. 1980, Cell 21: 285-294). Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors p5KETO2 wurde das 2.8 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 3, Konstruktkarte). In der Abbildung 3 beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse

(204 bp), Fragment *KETO2* (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

## 5 Beispiel I.5A:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer PR7 (SEQ ID NO: 33) und PR10 (SEQ ID NO: 36) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute

	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

- 5 Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten.

Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

- 15 Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 33) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 35) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 34) und PR10 (SEQ ID NO: 36) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 25 Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526 bis 9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 30 - 0.2 mM sense Primer (PR7 SEQ ID NO: 33 bzw. PR8 SEQ ID NO: 34)
- 0.2 mM antisense Primer (PR9 SEQ ID NO: 35 bzw. PR10 SEQ ID NO: 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

- 35 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94_C	2 Minuten
	35X	94_C	1 Minute
		50_C	1 Minute
5		72_C	1 Minute
	1X	72_C	10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95\_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40\_C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 mg A7/9 Amplifikat
- 0.25 mg A8/10 Amplifikat

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30\_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 mg A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 33) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 36) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)

- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 5 - 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |    |     |      |            |
|----|-----|------|------------|
| 10 | 1X  | 94_C | 2 Minuten  |
|    | 35X | 94_C | 1 Minute   |
|    |     | 50_C | 1 Minute   |
|    |     | 72_C | 1 Minute   |
|    | 1X  | 72_C | 10 Minuten |

15

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 33 und SEQ ID NO: 36 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

20

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

25

Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO2 wurde das 1027 Bp SpHI-Fragment KETO2 in den SpHI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO2 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO2.

30

Zur Herstellung einer Expressionskassetten pJAP3PKETO4 wurde das 1032 Bp SpHI-EcoRI Fragment KETO4 (in Beispiel 3 beschrieben) in den SpHI-EcoRI geschnittenen

35

Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO4 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem *rbcS* Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO4.

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB bp *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJAP3PKETO2 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 4, Konstruktkarte). In der Abbildung 4 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV

Beispiel 1.5.B:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Nostoc sp. PCC 7120* Ketolase in *Tagetes erecta*.

Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin NADPH Oxidoreductase) aus *Arabidopsis thaliana*. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion -635 bis -1 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-1 (SEQ ID No.90) und FNR-2 (SEQ ID No. 91) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR1-2 (-635 bis -1) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs

- 0.2 mM FNR-1 (SEQ ID No. 90)
- 0.2 mM FNR-2 (SEQ ID No. 91)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul Pfu Polymerase (Stratagene)
- 5 - 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94°C 2 Minuten
- 10 35X 94°C 1 Minute
- 50°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute
- 1X 72°C 10 Minuten

- 15 Das 653 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

- 20 Sequenzierung des Klons pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt. Das Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert.

Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

25

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 635 bp SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITFNR.

30

Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 805 bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITFNR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

35



Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

- 5 Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5FNRNOST wurde das 2.4 Kb SacI-XhoI Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 5, Konstruktkarte). In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den duplizierten FNR Promotor (655 bp), Fragment *rbcS Transit Peptid* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *Nost Ketolase* (799 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment *35S Terminator* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 1.5C:

- Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Nostoc sp.*  
 15 *PCC 7120* Ketolase in *Tagetes erecta*.

- Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

- Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer AP3-1 (SEQ ID No.93) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 30 Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:
- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
  - 0.25 mM dNTPs
  - 35 - 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 93)
  - 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)

- 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ul Aq. Dest.

5 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute
- 50°C 1 Minute
- 10 72°C 1 Minute
- 1X 72°C 10 Minuten

Das 929 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3 erhalten.

15

Sequenzierung des Klons pAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

20

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pAP3 hergestellt. Die Region 10200 - 9771 wurde mit den Primern AP3-1 (SEQ ID No. 93) und Primern AP3-4 (SEQ ID No. 96) amplifiziert (Amplifikat A1/4), die Region 9526-9285 wurde mit den AP3-3 (SEQ ID No. 95) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) amplifiziert (Amplifikat A2/3).

25

30 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200 - 9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 ul Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

35

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM sense Primer (AP3-1 SEQ ID No. 93 bzw. AP3-3 SEQ ID No. 95)
- 0.2 mM antisense Primer (AP3-4 SEQ ID No. 96 bzw. AP3-2 SEQ ID No. 94)
- 5 - 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

10

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

15 1X 72°C 10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A1/4 und A2/3, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 - 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A1/4 und A2/3 erfolgte in einem 17.6 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 25 - 0.5 ug A1/4 Amplifikat
- 0.25 ug A2/3 Amplifikat

Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

30

- 17.6 ul A1/4 und A2/3-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 uM dNTPs
- 2 ul 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

35

Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AP3-1 SEQ ID No. 93) und eines antisense spezifischen Primers (AP3-2 SEQ ID No. 94) amplifiziert.

5 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 10 - 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 93)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 15 - 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 20 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute
- 50°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute
- 1X 72°C 10 Minuten

25

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 93 (AP3-1) und SEQ ID No. 94 (AP3-2) resultierte in einem 783 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3P erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 - 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

30

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 783 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITAP3P. Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3NOST wurde das 805 Bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3NOST.

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3NOST wurde das 2.6 KB bp SacI-XhoI (partielle SacI Hydrolyse) Fragment aus pS5AP3NOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 6, Konstruktkarte). In der Abbildung 6 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (783 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207 bp), Fragment NOSTF-G (792 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die Nostoc Ketolase, Fragment term (795 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

#### Beispiel I.6:

#### Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28\_C/20-200 mE/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21\_C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

Ein beliebiger Agrobacterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt *bar* oder *pat*) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reporter-

gene tragen kann wird (beispielsweise pS5KETO2 und pS5AP3PKETO2), über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium re-suspendiert, dass eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird für die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

10

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolyllessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 mMol/m<sup>2</sup> x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

25

30 Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA<sub>3</sub>, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

35

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12  
5 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinku-  
biert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration  
wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt  
10 werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- Die Zugabe von  $\text{AgNO}_3$  (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den  
Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt  
15 sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die  
Kultur aus.
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung fin-  
20 den. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium  
positioniert werden inkubiert werden.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Ex-  
pressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

- 25 Mit pS5KETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs18-1 und cs18-2, mit  
pS5AP3PKETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs19-1, cs19-2 und cs19-3.  
Mit pS5FNRNOST wurde beispielsweise erhalten: ms 103-1, ms103-2, ms103-3, mit  
pS5AP3NOST wurde beispielsweise erhalten: ms 104-1, ms104-2, ms104-3.

30

#### Beispiel I.8

#### Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

#### Beispiel I.8.1

- 35 Trennung von Carotinoidestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

## Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ml).

- 5 Das Lösungsmittel wird evaporiert und die Carotinoide in 100 bis 200 ml Petrol-ether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

- 10 Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auf Silica60 F254- Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrol-ether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoidestern) auf der TLC werden ausgekratzt.

- 15 Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 ml Aceton eluiert, das Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

- 20 Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

## Beispiel I.9

## Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

- 25 Allgemeine Arbeitsvorschrift

- 30 Gemörsertes Petalenmaterial (50 bis 100 mg Frischgewicht) wird mit 100 % Aceton (dreimal 500 ml; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 400 ml Aceton aufgenommen (Absorption bei 475 nm zwischen 0.75 und 1,25) und 5 min im Ultraschall-Bad behandelt. Der Carotinoid-Extrakt wird mit 300 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) gemischt und 5 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 bis 200 ml Cholesterol-Esterase (Stammlösung: 6,8 units/ml einer Cholesterol-Esterase von Pseudomonas spec.). Nach 8 bis 12 Stunden wird nochmals 100 bis 200 ml Enzym zugegeben; Hydrolyse der Ester erfolgt innerhalb von 24 Stunden bei Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe 35 0.35 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O und 500 ml Petroether wird gut gemischt und zentrifugiert



(3 Minuten; 4500 g). Petrolether-Phase wird abgezogen und nochmals mit 0,35 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O (anhydrous) gemischt. Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 g. Petrolether wird evaporiert und freie Carotinoide werden in 100 bis 120 ml Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

Beispiel I.10:

Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifischen Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711 bis 1721).

Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al.(1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) mit einander verbunden sind.

Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* codiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID NO: 49) und PR10 (SEQ ID NO: 52) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) codiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl genomischer DNA aus *A.thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)

- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

5

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94_C	2 Minuten
	35X	94_C	1 Minute
10		50_C	1 Minute
		72_C	1 Minute
	1X	72_C	10 Minuten

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 49) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 51) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 50) und PR10 (SEQ ID NO: 52) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200 bis 9771 und 9526 bis 9285 des AP3 Promoters codieren, erfolgte in 50 ml Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

35

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)

- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49) bzw. PR8 (SEQ ID NO: 50)
- 0.2 mM PR9 (SEQ ID NO: 51) bzw. PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 5 - 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |    |     |      |            |
|----|-----|------|------------|
| 10 | 1X  | 94_C | 2 Minuten  |
|    | 35X | 94_C | 1 Minute   |
|    |     | 50_C | 2 Minuten  |
|    |     | 72_C | 3 Minuten  |
|    | 1X  | 72_C | 10 Minuten |

15

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind.

- 20 Die Denaturierung (5 min bei 95\_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40\_C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 mg A7/9
- 25 - 0.25 mg A8/10

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30\_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 30 - 17.6 ml A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 49) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 52) amplifiziert.

5 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 10 - 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 15 - 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 20 1X 94\_C 2 Minuten
- 35X 94\_C 1 Minute
- 50\_C 1 Minuten
- 72\_C 1 Minuten
- 1X 72\_C 10 Minuten

25

Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID NO: 49 und PR10 SEQ ID NO: 52 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

30

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der

35

den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

5 Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al.(1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) sowie der Primer PR40 (Seq ID NO: 54) und Primer PR41 (Seq ID NO: 55) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

10

Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml p35SGUS INT
- 15 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR40 (SEQ ID NO: 54)
- 0.2 mM PR41 (SEQ ID NO: 55)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 20 - 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94\_C 2 Minuten
- 25 35X 94\_C 1 Minute
- 53\_C 1 Minuten
- 72\_C 1 Minuten
- 1X 72\_C 10 Minuten

30 Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klon mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.

35

Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp Sall-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem Sall-BamHI geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3'Ende des *rbcs* Transitpeptides enthält, heisst pJA11 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

In der Abbildung 7 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcs* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

#### Beispiel I.11

Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

Die Nukleinsäure, die die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält, wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42 SEQ ID NO: 56) und eines antisense spezifischen Primers (PR43 SEQ ID NO: 57) amplifiziert. Die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 138 bp 5'Nicht-translatierter Sequenz (5'UTR) und 297 bp der dem N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* wurden 100mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abge-

kühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID NO: 53) in cDNA umgeschrieben.

5 Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

10

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR42 (SEQ ID NO: 56)
- 0.2 mM PR43 (SEQ ID NO: 57)
- 15 - 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

20

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 25 - 0.2 mM PR44 (SEQ ID NO: 58)
- 0.2 mM PR45 (SEQ ID NO: 59)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

30

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94_C	2 Minuten
	35X	94_C	1 Minute
35		58_C	1 Minuten
		72_C	1 Minuten

1X 72\_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38 ) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminalen Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 bp 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI3. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminalen Region der Epsilon-Cyclase.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID NO: 76) und PRCHRC3 (SEQ ID NO: 77) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.



Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst pJCI3.

5

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

10

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 8, Konstruktkarte).

15

In der Abbildung 8 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *5sense* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *5anti* die 5'Region der Epsilon-cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

20

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 bp SacI-XhoI Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 9, Konstruktkarte).

25

In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment *CHRC* den Promoter (1537 bp), Fragment *5sense* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *5anti* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

30

#### Beispiel I.12

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

35

Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46 SEQ ID NO: 60) und eines antisense spezifischen Primers (PR47 SEQ ID NO: 61) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 bp 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 bp der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel I.11 beschrieben.

Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel I.11 unter Verwendung des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID NO: 53) beschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR46 (SEQ ID NO: 60)
- 0.2 mM PR47 (SEQ ID NO: 61)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR48 (SEQ ID NO: 62)
- 0.2 mM PR49 (SEQ ID NO: 63)

- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

5 Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94\_C 2 Minuten  
 35X 94\_C 1 Minute  
       58\_C 1 Minuten  
 10       72\_C 1 Minuten  
       1X 72\_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 60 und SEQ ID NO: 61 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 62 und SEQ ID NO: 63 resultierte  
 15 in einem 396 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten  
 20 jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klon wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJA11 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

25 Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp PR48-PR49 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJA11. Der Klon, der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJA14. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Antisense-Fragment der  
 30 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392 Bp PR46-PR47 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJA14. Der Klon, der 392 bp 3'terminale Region  
 35 der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJA15. Durch die

Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragment 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

5 Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900). Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI5 wurde das 2523 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI5 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 10, Konstruktkarte).

10 In der Abbildung 10 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *3sense* die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *3anti* die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

15

#### Beispiel I.13

#### Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

20 Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters wurde durch zwei unabhängige Klonierungsstrategien, Inverse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457-463) unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Tagetes erecta*, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.

25 Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 µg genomische DNA in einem 25 µl Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300 µl verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO: 64) und PR51 (SEQ ID NO: 65) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 bp des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 bp des  
30 5'terminalen Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe Abbildung 11).

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 1 ml Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR50 (SEQ ID NO: 64)
- 0.2 mM PR51 (SEQ ID NO: 65)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 10 - 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 15 1X 94\_C 2 Minuten
- 35X 94\_C 1 Minute
- 53\_C 1 Minute
- 72\_C 1 Minute
- 1X 72\_C 10 Minuten

20

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 11).

- 25 Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 45. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

30

Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested primers) durchgeführt.

Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

35

- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)

- 0.2 mM jedes dNTPs
- 0.2 mM PR60 (SEQ ID NO: 66)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 5 - 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 20 ml aufgefüllt

- AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.

10

Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 93\_C: 1 Minute, 95\_C: 1 Minute
- 5X 94\_C: 30 Sekunden, 62\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten
- 15 1X 94\_C: 30 Sekunden, 25\_C: 3 Minuten, ramp to 72\_C in 3 Minuten,  
72\_C: 2.5 Minuten
- 15X 94\_C: 10 Sekunden, 68\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;  
94\_C: 10 Sekunden, 68\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;  
94\_C: 10 Sekunden, 29\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten
- 20 1X 72\_C: 5 Minuten

Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben
- 25 beschrieben)
- 0.8 mM dNTP
- 0.2 mM PR61 (SEQ ID NO: 67)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 30 - 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 21 ml aufgefüllt

Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 35 12X 94\_C: 10 Sekunden, 64\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;  
94\_C: 10 Sekunden, 64\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;

94\_C: 10 Sekunden, 29\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten  
1X 72\_C: 5 Minuten

Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

5

- 1 ml einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)

10

- 0.8 mM dNTP
- 0.2 mM PR63 (SEQ ID NO: 68)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 10 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 100 ml aufgefüllt

15

Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

20X 94\_C: 15 Sekunden, 29\_C: 30 Sekunden, 72\_C: 2 Minuten  
1X 72\_C: 5 Minuten

20

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 12).

25

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 46. Diese Sequenz ist identisch mit der Sequenz SEQ ID NO: 45, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

30

Der pCR2.1-Klon, der das 312 bp Fragment (SEQ ID NO: 45) des Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert wurde, enthält, heisst pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der IR Konstrukte verwendet.

35

## Beispiel I.14

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die Promoterregion der Epsilon-Cyclase cDNA).

5

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel I.10) oder des blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession NO: AF099501).

10

Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel I.10) mit einander verbunden sind.

15

Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel I.13 ) und der Primer PR124 (SEQ ID NO: 70) und PR126 (SEQ ID NO: 72) bzw. der Primer PR125 (SEQ ID NO: 71) und PR127 (SEQ ID NO: 73) hergestellt.

20

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR124 (SEQ ID NO: 70)
- 0.2 mM PR126 (SEQ ID NO: 72)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

30

Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

35



- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR125 (SEQ ID NO: 71)
- 5 - 0.2 mM PR127 (SEQ ID NO: 73)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

10 Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94_C	2 Minuten
	35X	94_C	1 Minute
		53_C	1 Minuten
15		72_C	1 Minuten
	1X	72_C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem  
20 361 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert.  
25 Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID NO: 45. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJA11 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

30 Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJA11. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der sense Orientierung enthält, heisst cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promo-  
35 ter und das Intron eingefügt.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361Bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heisst cs44. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Anti-sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO: 77) und PRCHRC5' (SEQ ID NO: 76) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst cs45.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3'Terminus des Epsilon-Cyclase antisense Fragmentes in cs45 kloniert. Das AP3P-Promoterfragments aus pJAI1 wurde unter Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenzierung mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 28 (AL132971) identische Sequenz. Dieser Klon pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 bp Sall-XhoI Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den XhoI geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält heisst cs46.

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO 02/00900).

- 5 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5A17 wurde das 1685bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 13, Konstruktkarte). In der Abbildung 13 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in anti-sense Orientierung.

- 15 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5C17 wurde das 2445bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 14, Konstruktkarte).

- 20 In der Abbildung 14 beinhaltet Fragment *CHRC* den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CA17 wurde das 3219bp SacI-XhoI Fragment aus cs46 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 15, Konstruktkarte)

- 25 In der Abbildung 15 beinhaltet Fragment *CHRC* den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das
- 30 Fragment *AP3P* das 771 bp AP3P-Promoterfragment in antisense Orientierung.

#### Beispiel I.15

Herstellung transgener *Tagetes* Pflanzen mit reduzierter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

- 35 *Tagetessamen* werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die

Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28\_C / 20 bis 200 mE / 3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21\_C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.

5 Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

10 Der Agrobakterium tumefaciens Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid pS5Al3 transformiert. Die Anzucht des transformierten A. tumefaciens Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedingungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28\_C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 15 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, das eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

20 Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolyllessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die 25 Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 mMol/m<sup>2</sup> x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevor- 30 zugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timen- tin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effi-

zient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberellinsäure  $GA_3$ , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- Die Zugabe von  $AgNO_3$  (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit dem Expressionskonstrukt pS5Al3 folgende Linien erhalten:

CS30-1, CS30-3 und CS30-4

---

## Beispiel I.16:

Charakterisierung der transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen mit reduzierter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

5 Das Blütenmaterial der transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen aus Beispiel I.15 wurde in flüssigem Stickstoff gemörsernt und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ml). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100 ml Aceton resuspendiert.

10 Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnten die individuellen Carotinoide quantifiziert werden. Die HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

15 Tabelle 2 zeigt das Carotinoidprofil in *Tagetes* petalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen *Tagetes*- und Kontroll*tagetes*pflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in [ug/g] Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben.

20 Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch veränderten Pflanzen mit reduzierter epsilon-Cyclase-Aktivität einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des "β-Carotin-Weges", wie beispielsweise β-Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des "α-Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

25 Tabelle 2

Pflanze	Lutein	b-Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)

## Beispiel II

## Herstellung astaxanthinhaltiger Pflanzenteile der Gattung Tagetes

- 5 Die Blütenköpfe oder die Petalen der gemäß Beispiel I.6 hergestellten astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes werden abgetrennt und getrocknet. Anschließend werden die getrockneten Blütenköpfe oder Petalen durch Zerkleinerung in Pulverform überführt.

## Beispiel III

- 10 Herstellung von astaxanthinhaltigen Extrakten und weitere Aufreinigung

- 15 Getrocknete Blütenblätter oder getrocknete Blütenköpfe von Tagetes erecta, hergestellt nach Beispiel I.6 werden in einem Homogenisator mit einem Überschuß (etwa 10 Teile Lösungsmittel mit einem Teil Pflanzenmaterial) an Lösungsmittel (wie z.B. Aceton, Hexan, Methylenchlorid, Methyl-tertiär-Butyl-Ether, Tetrahydrofuran, Ethanol, Heptan, Cycloheptan oder Petroether, aber nicht ausschließlich beschränkt auf diese) oder mit einem Lösungsmittelgemisch (wie z.B. Aceton/Hexan, Ethanol/Hexan (50:50, v/v) oder Aceton/Methanol (7:3, v/v) homogenisiert und im Dunkeln und in der Kühle unter Schütteln extrahiert. Der Rückstand kann bis zu dreimal mit dem verwendeten Lösungsmittel/ Lösungsmittelgemisch re-extrahiert werden. Das gesammelte organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch wird mittels Evaporator evaporiert, bis ein eingeeengtes Konzentrat erhalten wird. Zusätzlich kann nochmals mit Hexan extrahiert werden. Das verwendete Hexan wird (wiederum im Dunklen und in der Kühle) evaporiert.
- 25 Das solchermaßen hergestellte Konzentrat wird in Hexan gelöst und mittels Säulenchromatographie mit Silica-Material chromatografiert. Ein Teil Silicamaterial wird dazu mit 1-2 Teilen Carotinoidlösung vermischt und in eine Säule gepackt. Die Säule wird ausgiebig mit Hexan im Dunklen und in der Kühle gewaschen. Das Eluat wird verworfen.
- 30 Ketocarotinoide, besonders Astaxanthin, wird durch eine Mischung von Hexan und Ethanol (2-5% Ethanol in Hexan) eluiert, bis eine orange-rötliche Fraktion eluiert. Dieses orange-rötliche Eluat wird gesammelt, bis die Farbe sich ändert. Das orange-rötlich gefärbte Eluat enthält Astaxanthin als Gemisch aus Mono- und Diestern.

## Beispiel IV

Herstellung von extrudiertem Forellenfutter, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes

5

Die folgenden Komponenten werden in einem Doppelschneckenextruder extrudiert.

<b>Komponenten</b>	<b>(%)</b>	<b>Einwaage f. 500 kg</b>
		<b>Kg</b>
Fischmehl	30,00	150,00
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00
Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

- 10 Die pulverförmigen, prozessierten astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, beispielsweise hergestellt nach Beispiel II, werden vor der Extrusion als Komponente zugegeben.

- 15 Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes in flüssiger Form, beispielsweise hergestellt nach Beispiel III, werden nach der Extrusion auf das Extrudat aufgesprüht (Applikation durch PPA-Methode).

- 20 Die Astaxanthin-Wirkstoff-Dosierung liegt bei 10, 20 und 40 mg Astaxanthin pro kg Diät.

Nach Beendigung des Extrusionsprozesses wird das Extrudat getrocknet und gekühlt.



## Beispiel V

Orale Verabreichung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Forellen in einem Forellenstandardfutter – Prüfung der Bioverfügbarkeit.

Das Forellenfutter, enthaltend die erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierstoffe, wird gemäß Beispiel IV hergestellt und an Forellen (durchschnittliche Lebendmasse von 180 g) oral verabreicht. Es werden 3 Konzentrationen getestet: 10, 20 und 40 mg Astaxanthin aus der erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung pro kg Diät.

Die Haltung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- Die Forellen erhalten standardmäßig eine Adaptationsphase von 14 Tagen.
- Während des Fütterungsversuches werden 10 Forellen pro Becken in 80 l Wasser fassenden Durchfluß-Kunststofftanks gehalten. Die Wassertemperatur liegt bei 15°C. Das Wasser wird biologisch gereinigt und es werden täglich mindestens 10% der Gesamtwassermenge durch Frischwasser ersetzt.
- Die Beleuchtungsdauer liegt bei 12 Stunden pro Tag, um eine vorzeitige Geschlechtsreife der Tier zu vermeiden.
- Die Anzahl Becken pro Behandlung liegt bei 3. Dies ist äquivalent zu 30 Forellen pro Dosisstufe.
- Aufbewahrung der Diäten erfolgt bei -20°C, um Astaxanthinverluste zu vermeiden. Das Futter wird portionsweise (wochenweise) aufgetaut und verabreicht.
- Die Versuchsdauer beträgt 8 Wochen.

Die Fütterung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- Bei den verabreichten Versuchsdieten handelt es sich um das gemäß Beispiel IV hergestellte extrudierte Forellenfutter, das zusätzlich noch öl-gecoated wird.

- Während der Adaptationsphase wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies Forellenstandardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin verabreicht.

- 5
- Als Negativkontrolle wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies Forellenstandardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin während des gesamten Versuchszeitraumes verabreicht.

- Die Fütterung erfolgt 2x täglich von Hand bis zur Sättigung der Tiere.

10

Untersucht wird der Einfluß der erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung sowohl auf Leistungsparameter der Fische, wie Futteraufnahme, Futterverwertung und Lebendmassezuwachs als auch auf die Bioeffizienz der Pigmentierung.

- 15
- Statisch ausgewertet werden durchschnittlicher Futterverbrauch pro Fisch, Futteraufwand und Lebendmassezuwachs.

Die Pigmentierung der Fische wird durch remissionspektrophotometrische Messungen (Minolta-a-Wert = Rotwert am Filetanschnitt) und durch Bestimmung des Astaxanthingehalts (mg/kg) im Filet jeweils im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen.

20

Die Minoltawerte a-Werte, welche den Rotanteil des Farbtöns repräsentieren, nehmen mit kleiner werdender Steigung der Funktion dosisabhängig zu. Die Minolta b- Werte, die den Gelbanteil widerspiegeln liegen im negativen Bereich oder bewegen sich um Null. Dies bedeutet der Rotton der Forellenfilets weist eine Abhängigkeit zu der aufgenommenen Astaxanthinmenge auf.

25

Während des Versuches werden für die beobachteten Leistungsparameter sowohl zwischen als auch innerhalb der Behandlungen (Astaxanthinhaltiges Pulver, astaxanthinhaltiger Extrakt in flüssiger Form, synthetisches Astaxanthin, Negativkontrolle) keine statistisch gerichteten Unterschiede beobachtet.

30

Es zeigt sich, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bei der Pigmentierung von Forellen als Vertreter der Salmoniden

35

bioverfügbar sind und zudem zu keinen adversen Effekten auf die biologische Leistung der Forelle führen.

## Patentansprüche

1. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet werden.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.
5. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht werden.
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.
- 5 8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatridae.
- 10 9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.
- 15 10. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Eidotter.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.
- 20 12. Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfutterkomponenten.
- 25 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozessiert werden, die ein Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln ermöglicht.
- 30 14. Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

15. Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

5

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.

10

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.

15

18. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht werden.

20

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.

25

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.

30

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatridae.
- 5 22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.
- 10 23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Ei.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.
- 15 25. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.
- 20 26. Tierfutterzubereitung, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.
- 25 27. Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.
28. Pigmentiermittel nach Anspruch 27, bestehend aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.
- 30 29. Pigmentiermittel nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.

Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

#### Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen, die Tierfutterzubereitungen selbst, ein Verfahren zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmentierter Tiere und Tierprodukte.

10



Abbildung 1: Nukleotidsequenzvergleich

```
KETO2.seq ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAAGCGCTGAGGCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTGCAGGCAGCTCTGACGTGTTGC 10C
X86782.seq ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAAGCGCTGAGGCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTGCAGGCAGCTCTGACGTGTTGC 10C

KETO2.seq GTACATGGGCGAACCAGTACTCGCTTCCGTCAGAGGAGTCAGACGCGGCCGCCCGGGACTGAAGAATGCCCTACAAGCCACCACCTTCCGACACAAAGGG 20C
X86782.seq GTACATGGGCGAACCAGTACTCGCTTCCGTCAGAGGAGTCAGACGCGGCCGCCCGGGACTGAAGAATGCCCTACAAGCCACCACCTTCCGACACAAAGGG 20C

KETO2.seq CATCACAATGGCGCTAGCTGTTCATCGGCTCCTGGGCGCAGTGTTCCTCCACGCCATTTTTCAAATCAAGCTTCCGACCTCCTTGGACCAAGCTGCACTGG 30C
X86782.seq CATCACAATGGCGCTAGCTGTTCATCGGCTCCTGGGCGCAGTGTTCCTCCACGCCATTTTTCAAATCAAGCTTCCGACCTCCTTGGACCAAGCTGCACTGG 30C

KETO2.seq CTGCCCGTGTTCAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGCAGCAGCTGCTGCACATCGTCGTAGTATTCCTTTGTCCTGGAGTTCTGTACACAGGCC 40C
X86782.seq CTGCCCGTGTTCAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGCAGCAGCTGCTGCACATCGTCGTAGTATTCCTTTGTCCTGGAGTTCTGTACACAGGCC 40C

KETO2.seq TTTTATCACCACGCATGATGCTATGCATGGCACCATCGCCATGAGAAACAGGCAGCTTAATGACTTCTTGGGCAGAGTATGCATCTCCTTGTACGCCTG 50C
X86782.seq TTTTATCACCACGCATGATGCTATGCATGGCACCATCGCCATGAGAAACAGGCAGCTTAATGACTTCTTGGGCAGAGTATGCATCTCCTTGTACGCCTG 50C

KETO2.seq GTTGTATACAAACATGCTGCACCGCAAGCATTGGGAGCACCACAACCACACTGGCGAGGTGGCAAGGACCCCTGACTTCCACAGGGGAAACCCCTGGCATT 60C
X86782.seq GTTGTATACAAACATGCTGCACCGCAAGCATTGGGAGCACCACAACCACACTGGCGAGGTGGCAAGGACCCCTGACTTCCACAGGGGAAACCCCTGGCATT 60C

KETO2.seq GTGCCCTGGTTTGCCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTTGGCGGCTCGCATGGTGGACGGTGGTTCATGCAGCTGCTGGGTGCGCCAA 70C
X86782.seq GTGCCCTGGTTTGCCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTTGGCGGCTCGCATGGTGGACGGTGGTTCATGCAGCTGCTGGGTGCGCCAA 70C

KETO2.seq TGGCGAACCTGCTGGTGTTCATGGCGGCGCGGCCATCCTGTCCGCTTCCGCTTGTTCCTACTTTGGCACGTACATGCCCCACAAGCCTGAGCCTGGCGC 80C
X86782.seq TGGCGAACCTGCTGGTGTTCATGGCGGCGCGGCCATCCTGTCCGCTTCCGCTTGTTCCTACTTTGGCACGTACATGCCCCACAAGCCTGAGCCTGGCGC 80C

KETO2.seq CGCGTCAGGCTCTTCACCAGCGTCATGAACCTGGTGGAGTGGCGACTAGCCAGGCGTCCGACCTGGTCAGCTTTCTGACCTGCTACCACTTCGACCTG 90C
X86782.seq CGCGTCAGGCTCTTCACCAGCGTCATGAACCTGGTGGAGTGGCGACTAGCCAGGCGTCCGACCTGGTCAGCTTTCTGACCTGCTACCACTTCGACCTG 90C

KETO2.seq CACTGGGAGCACCACCGCTGGGCCCTTTCGCCCTTGGTGGGAGCTGCCCAACTGCCCGCGCTGTCTGGCCGAGGTCTGGTTCTCTGCCTAG 99C
X86782.seq CACTGGGAGCACCACCGCTGGGCCCTTTCGCCCTTGGTGGGAGCTGCCCAACTGCCCGCGCTGTCTGGCCGAGGTCTGGTTCTCTGCCTAG 99C
```

Abbildung 2: Proteinsequenzvergleich

```
KETO2.pro  MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA 50
X86782.pro  MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA 50

KETO2.pro  R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L A V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W 100
X86782.pro  R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L R V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W 100

KETO2.pro  L P V S D A T A Q L V S G S S S L L H I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N 150
X86782.pro  L P V S D A T A Q L V S G T S S L L D I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N 150

KETO2.pro  R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I 200
X86782.pro  R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I 200

KETO2.pro  V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F 250
X86782.pro  V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F 250

KETO2.pro  R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L 300
X86782.pro  R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L 300

KETO2.pro  H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A 329
X86782.pro  H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A 329
```

Abbildung 3:

Konstrukt zur Überexpression des Ketolase (b-C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters (Tagetestransformationskonstrukt)

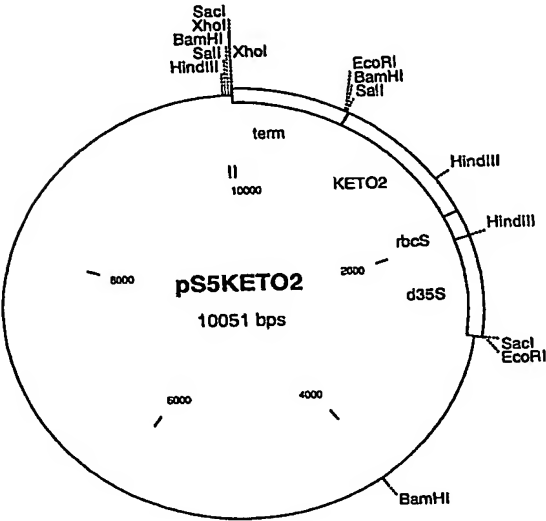


Abbildung 4:

Konstrukt pS5AP3PKETO2 zur Überexpression der Ketolase (b-C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit *rbcS* Transitpeptide aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Tagetestransformationskonstrukt) .

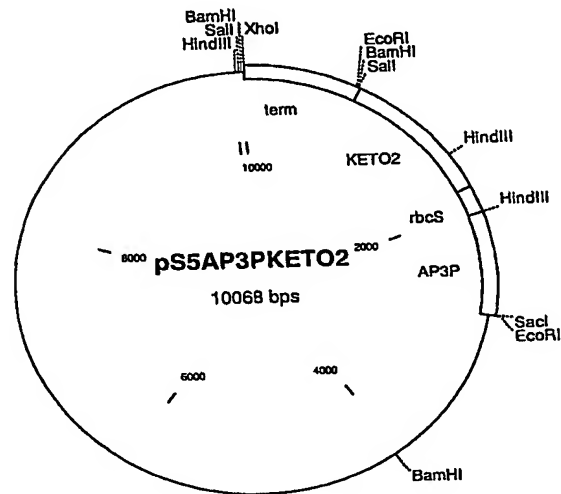


Abbildung 5

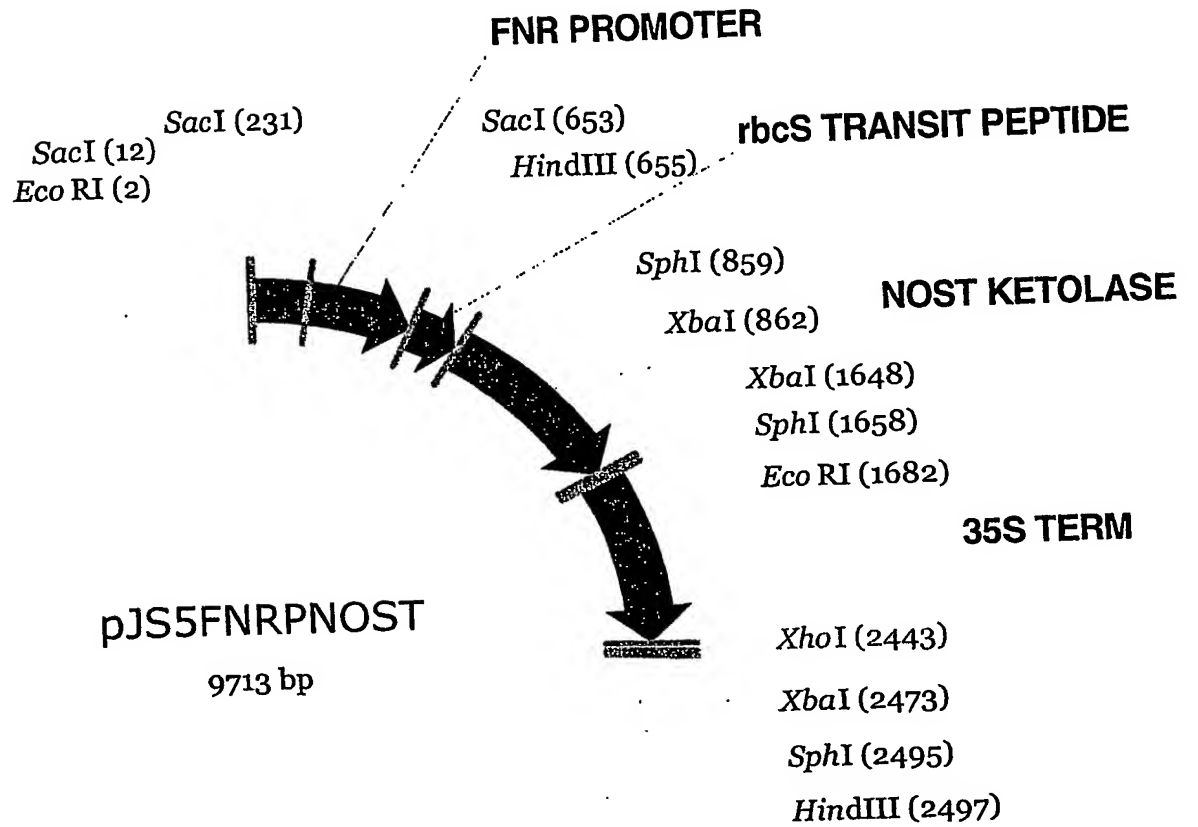


Abbildung 6

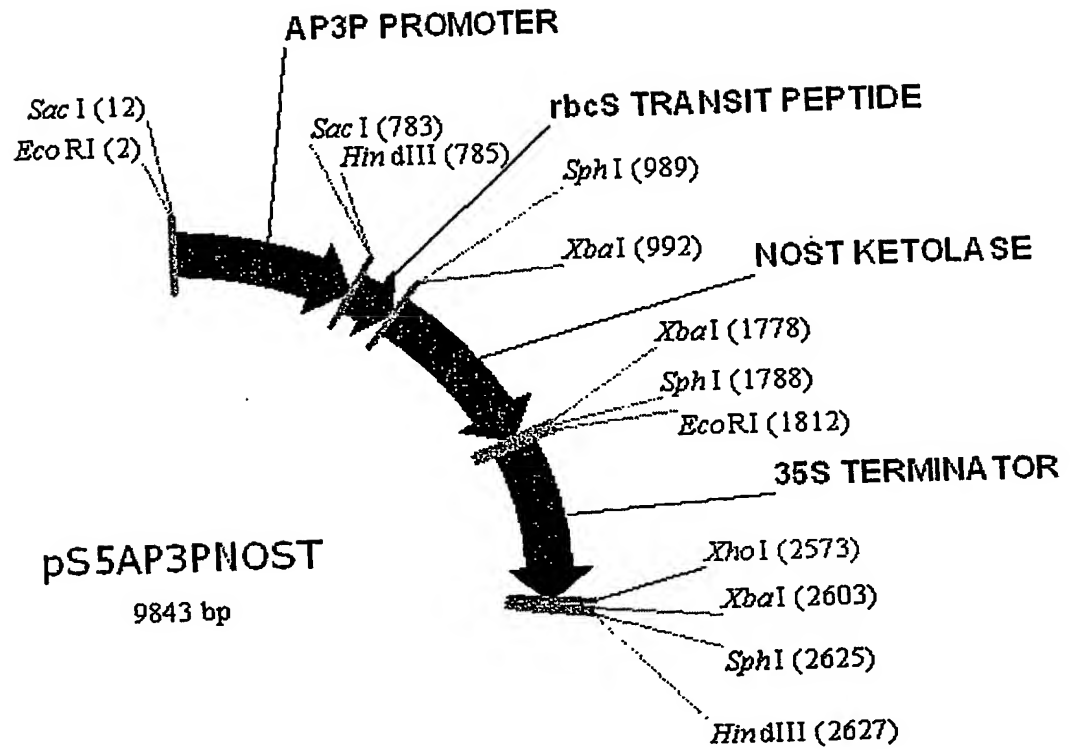


Abbildung 7:

Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blüten-spezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

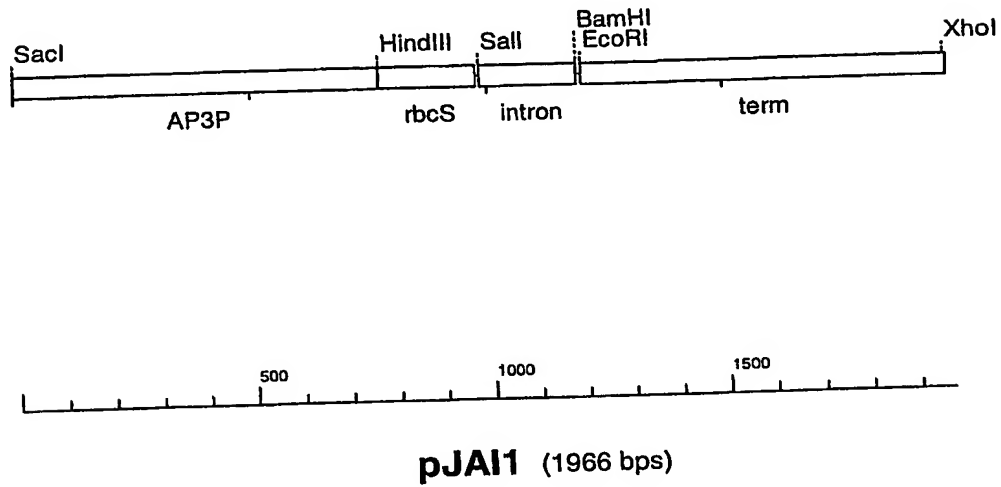


Abbildung 8: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

5

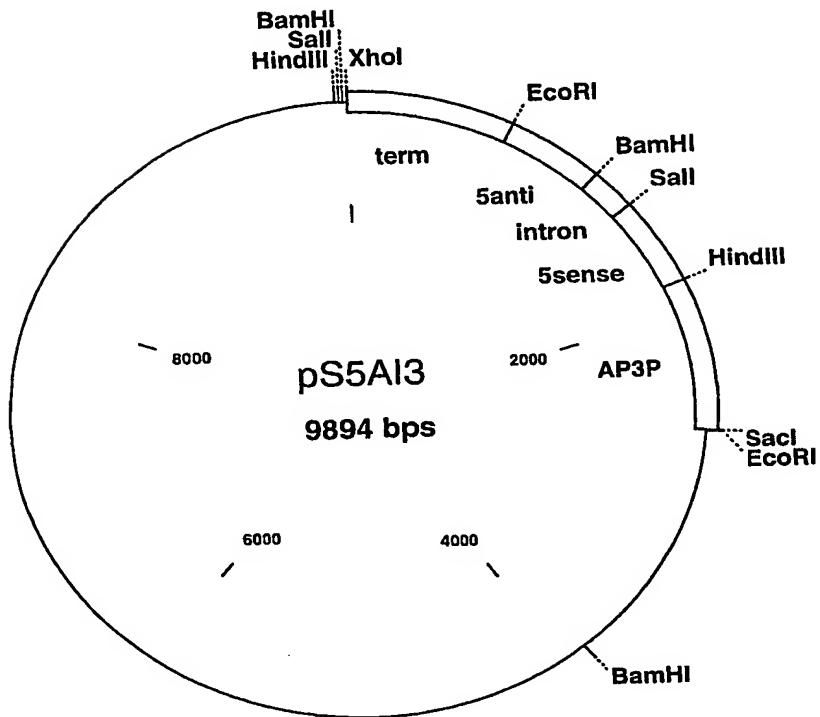




Abbildung 9: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminalen Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des CHRC-Promoters

5

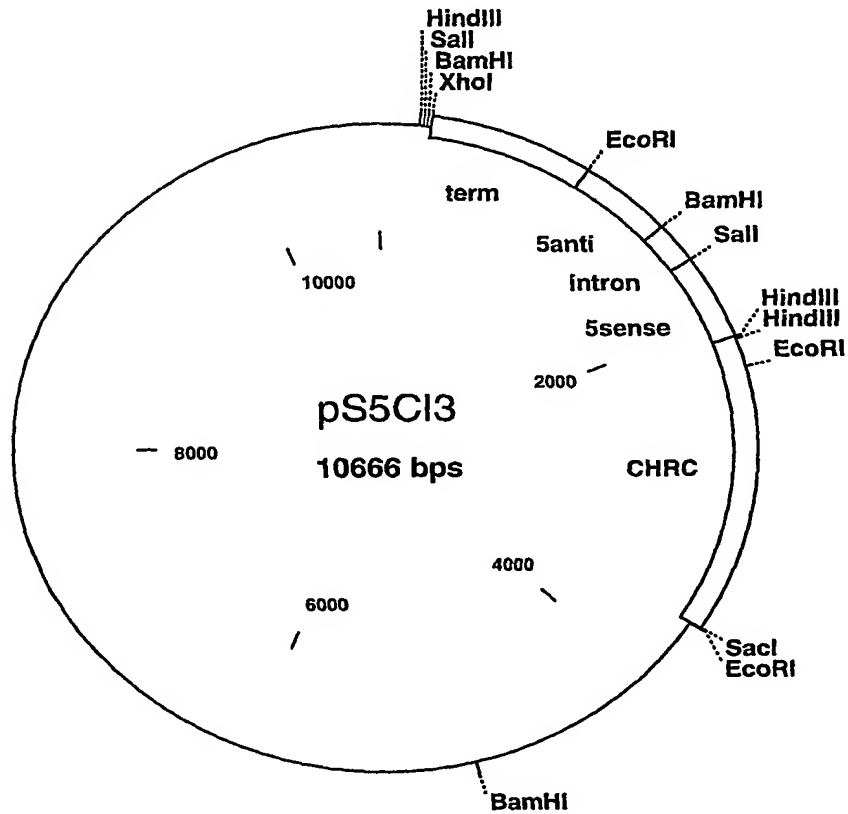


Abbildung 10: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 3'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

5

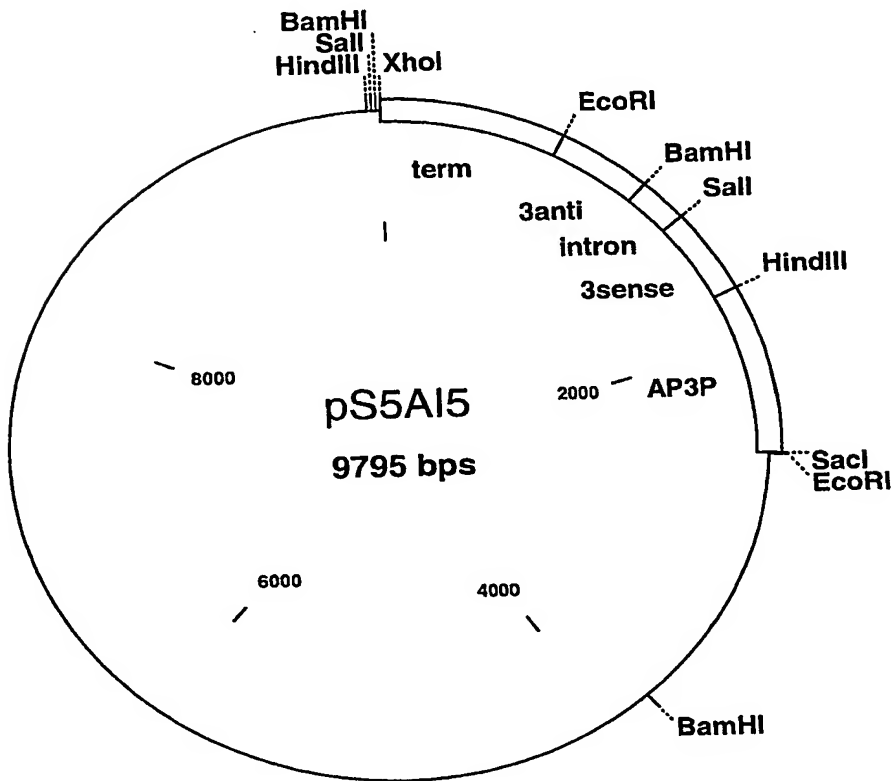


Abbildung 11: Inverse PCR-Amplifikat, das das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

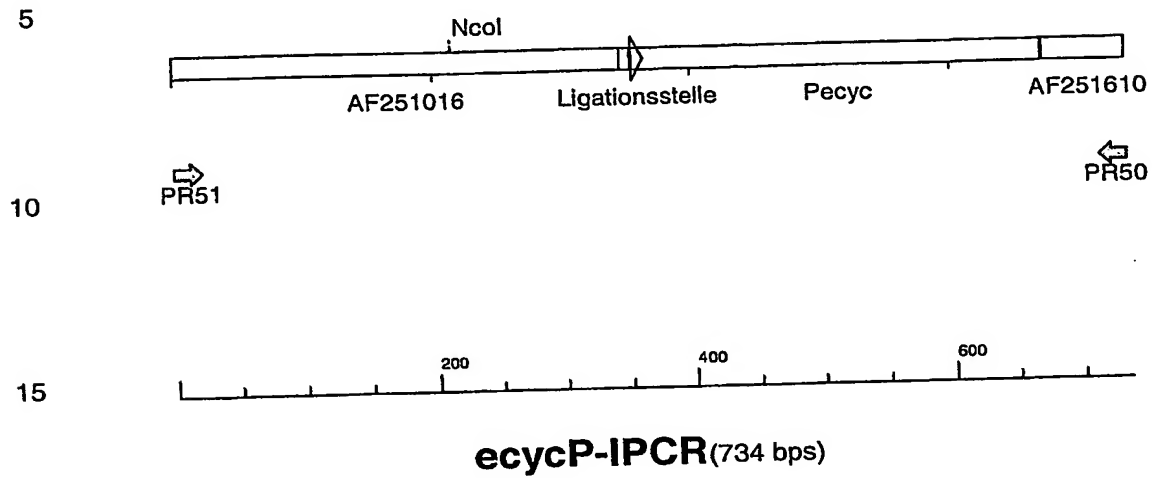


Abbildung 12: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

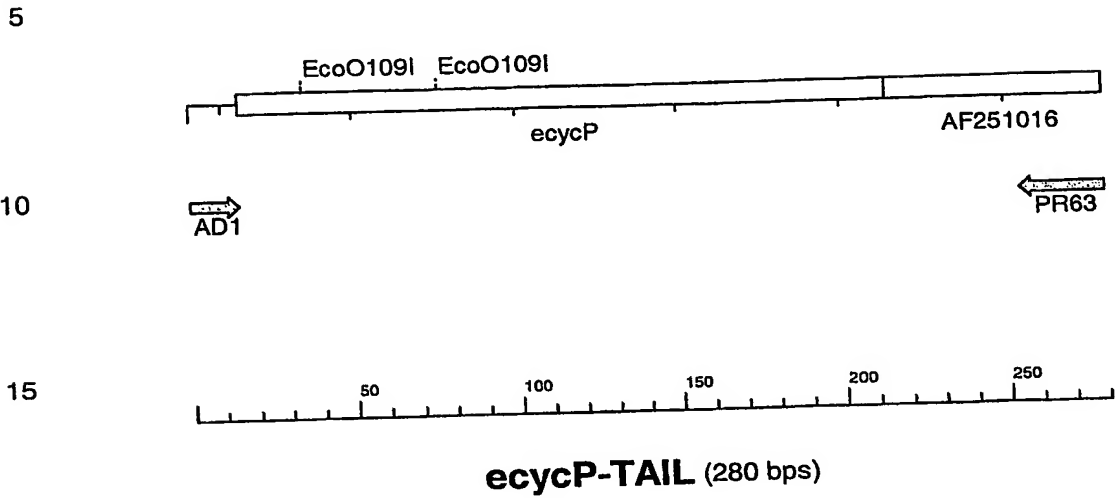


Abbildung 13: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des AP3P-Promoters

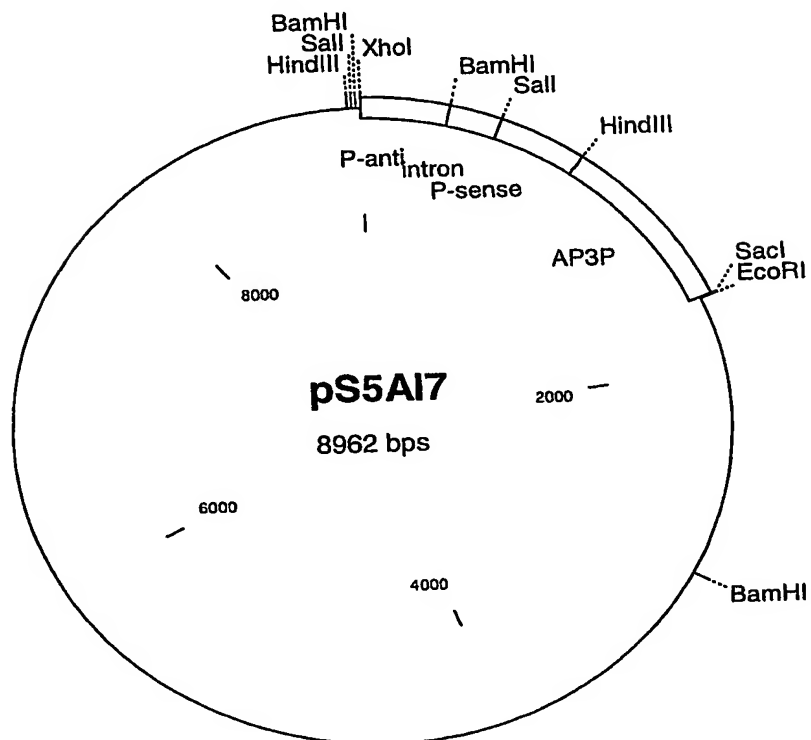


Abbildung 14: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters

5

10

15

20

25

30

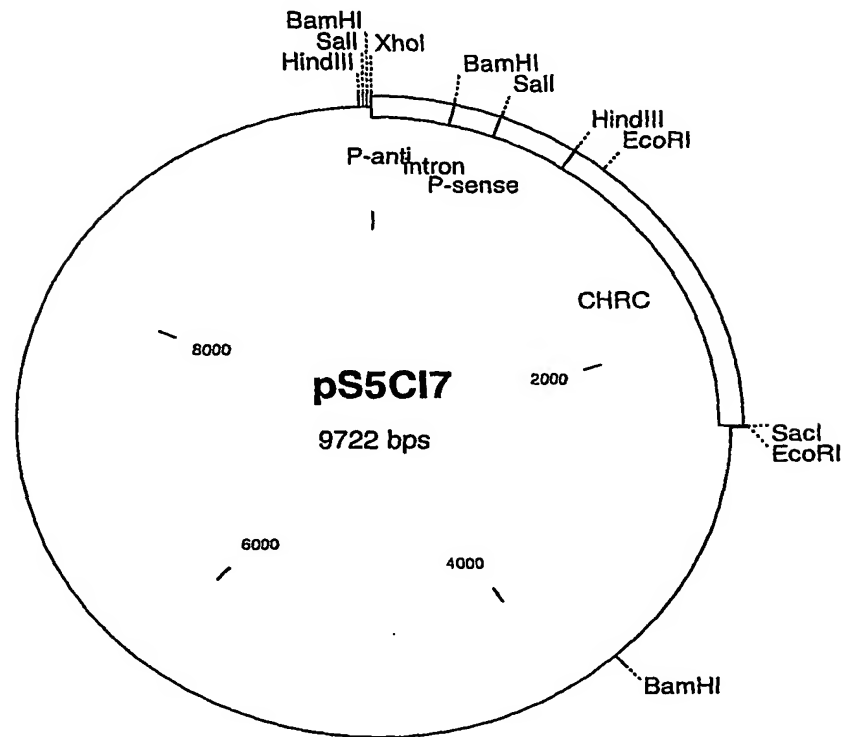
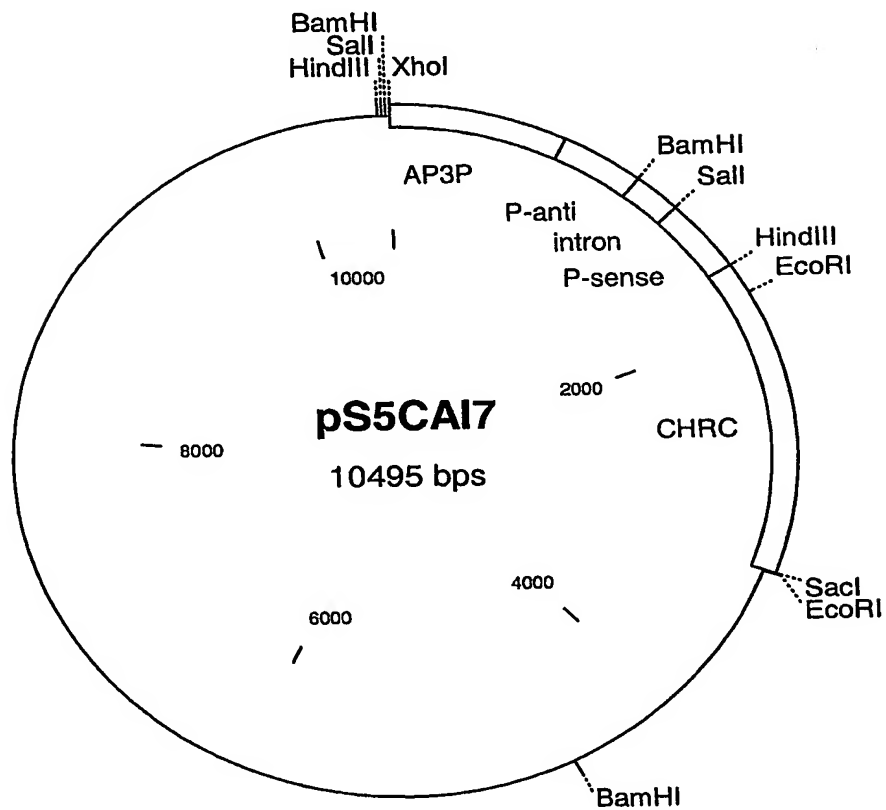


Abbildung 15: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch des CHRC-Promoters



SEQUENCE LISTING

5 <110> SunGene GmbH Co. KGaA

10 <120> Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der  
Gattung Tagetes als Futtermittel

15 <130> PF 54148

<160> 142

20 <170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1  
<211> 1771

30 <212> DNA  
<213> Haematococcus pluvialis

35 <220>  
<221> CDS

40 <222> (166)..(1155)  
<223>

45 <400> 1  
ggcagcagct tgcacgcaag tcagcgcgcg caagtcaaca cctgccggtc cacagcctca 60  
aataataaag agctcaagcg tttgtgcgcc tcgacgtggc cagtctgcac tgccttgaac 120  
50 ccgcgagtct cccgccgcac tgactgccat agcacagcta gacga atg cag cta gca 177  
Met Gln Leu Ala  
1



	gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag	225
	Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys	
	5 10 15 20	
5	gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg	273
	Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp	
	25 30 35	
10	gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa gag tca gac gcg gcc cgc ccg	321
	Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro	
	40 45 50	
15	gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc	369
	Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile	
	55 60 65	
20	aca atg gcg cta cgt gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac	417
	Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His	
	70 75 80	
25	gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg	465
	Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp	
	85 90 95 100	
30	ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc acg agc agc	513
	Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Thr Ser Ser	
	105 110 115	
35	ctg ctc gac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca	561
	Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr	
	120 125 130	
40	ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg	609
	Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met	
	135 140 145	
45	aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg	657
	Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu	
	150 155 160	
50	tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac	705
	Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His	
	165 170 175 180	
55	cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga	753
	His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly	
	185 190 195	
60	aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg	801
	Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met	
	200 205 210	
65	tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag	849
	Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln	

	215	220	225	
5	ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala 230 235 240	897		
10	ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro 245 250 255 260	945		
15	cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met 265 270 275	993		
20	aac tgg tgg aag tgc cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe 280 285 290	1041		
25	ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro 295 300 305	1089		
30	ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg 310 315 320	1137		
35	ggg ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcca Gly Leu Val Pro Ala 325	1185		
40	gctgggcatg cagggttggtg caggactggg tgagggtgaaa agctgcaggc gctgctgccg gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggagggggg tttgtagctg 330 335 340 345 350	1245		
45	tcgagcttgc cccatggatg aagctgtgta gtgggtgcagg gagtacaccc acaggccaac acccttgcag gagatgtctt gcgtcgggag gagtggtggg cagtgtagat gctatgattg 355 360 365 370 375 380	1305		
50	tatcttaatg ctgaagcctt taggggagcg acacttagtg ctgggcaggc aacgccctgc aaggtgcagg cacaagctag gctggacgag gactcgggtg caggcaggtg aagaggtgcg 385 390 395 400 405 410	1365		
	ggaggggtggt gccacaccca ctgggcaaga ccatgctgca atgctggcgg tgtggcagtg 415 420 425 430 435	1425		
	agagctgcgt gattaactgg gctatggatt gtttgagcag tctcacttat tctttgatat 440 445 450 455 460	1485		
	agatactggt caggcaggtc aggagagtga gtatgaacaa gttgagaggt ggtgcgctgc 465 470 475 480 485	1545		
	ccctgcgctt atgaagctgt aacaataaag tggttcaaaa aaaaaa 490 495 500 505 510	1605		
		1665		
		1725		
		1771		

&lt;211&gt; 329

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;400&gt; 2

10

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15

15 Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30

20 Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60  
 25

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80

30 Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95

35 Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
 100 105 110

40 Gly Thr Ser Ser Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
 115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
 130 135 140  
 45

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160

50 Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
 180 185 190

5 Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
 195 200 205

10 Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
 210 215 220

15 Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
 225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
 245 250 255

20 Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
 260 265 270

25 Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
 275 280 285

30 Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290 295 300

35 His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 325

40 <210> 3

<211> 1662

45 <212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

50 <220>

<221> CDS

&lt;222&gt; (168)..(1130)

&lt;223&gt;

5

<400> 3  
 cgggggcaact caagaaattc aacagctgca agcgcgcccc agcctcacag cgccaagtga 60

10 gctatcgacg tggttgtgag cgctcgacgt ggtccactga cgggcctgtg agcctctgcg 120

ctccgtcctc tgccaaatct cgcgtcgggg cctgcctaag tcgaaga atg cac gtc 176  
 Met His Val  
 1

15 gca tcg gca cta atg gtc gag cag aaa ggc agt gag gca gct gct tcc 224  
 Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser  
 5 10 15

20 agc cca gac gtc ttg aga gcg tgg gcg aca cag tat cac atg cca tcc 272  
 Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser  
 20 25 30 35

25 gag tcg tca gac gca gct cgt cct gcg cta aag cac gcc tac aaa cct 320  
 Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro  
 40 45 50

cca gca tct gac gcc aag ggc atc acg atg gcg ctg acc atc att ggc 368  
 Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly  
 55 60 65

acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttt caa atc agg cta ccg 416  
 Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu Pro  
 70 75 80

35 aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa gcc aca gcc 464  
 Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala  
 85 90 95

40 cag ctt ttg ggc gga agc agc agc cta ctg cac atc gct gca gtc ttc 512  
 Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe  
 100 105 110 115

45 att gta ctt gag ttc ctg tac act ggt cta ttc atc acc aca cat gac 560  
 Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp  
 120 125 130

gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg cac agg cag ctc aat gat ctc 608  
 Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu  
 135 140 145

50 ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac tac agc atg 656  
 Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met  
 150 155 160

	ctg cat cgc aag cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly 165 170 175	704
5	aaa gac cct gac ttc cac aag gga aat ccc ggc ctt gtc ccc tgg ttc Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe 180 185 190 195	752
10	gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu 200 205 210	800
15	gca tgg tgg gca gtg gtg atg caa atg ctg ggg gcg ccc atg gca aat Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn 215 220 225	848
20	ctc cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu 230 235 240	896
	ttc tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala 245 250 255	944
25	gca ggc tct cag gtg atg gcc tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala 260 265 270 275	992
30	tct gat gtg atg agt ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg cac tgg Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp 280 285 290	1040
35	gag cac cac agg tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg cag ctg ccc cac tgc Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys 295 300 305	1088
40	cgc cgc ctg tcc ggg cgt ggc ctg gtg cct gcc ttg gca tga Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala 310 315 320	1130
	cctgggtccct ccgctggtga cccagcgtct gcacaagagt gtcattgctac aggggtgctgc	1190
	ggccagtggc agcgcagtgc actctcagcc tgtatggggc taccgctgtg ccaactgagca	1250
45	ctgggcatgc cactgagcac tgggcgtgct actgagcaat gggcgtgcta ctgagcaatg	1310
	ggcgtgctac tgacaatggg cgtgctactg gggctctggca gtggctagga tggagtttga	1370
50	tgcattcagt agcgggtggc aacgtcatgt ggatgggtgga agtgctgagg ggtttaggca	1430
	gccggcattt gagagggcta agttataaat cgcattgctgc tcatgcgcac atatctgcac	1490
	acagccaggg aaatcccttc gagagtgatt atgggacact tgtattgggt tcgtgctatt	1550

gttttattca gcagcagtag ttagtgaggg tgagagcagg gtggtgagag tggagtgagt 1610

gagtatgaac ctggtcagcg aggtgaacag cctgtaatga atgactctgt ct 1662

5

<210> 4

<211> 320

10 <212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

15

<400> 4

Met His Val Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala

20 1 5 10 15

Ala Ala Ser Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His

25 20 25 30

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala

30 35 40 45

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr

50 55 60

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile

35 65 70 75 80

Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu

40 85 90 95

Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala

45 100 105 110

Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr

115 120 125

50 Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu

130 135 140

Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp  
145 150 155 160

5 Tyr Ser Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly  
165 170 175

10 Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val  
180 185 190

15 Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe  
195 200 205

Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro  
210 215 220

20 Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala  
225 230 235 240

25 Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro  
245 250 255

30 Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr  
260 265 270

35 Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp  
275 280 285

Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu  
290 295 300

40 Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala  
305 310 315 320

45 <210> 5

<211> 729

<212> DNA

50

<213> Agrobacterium aurantiacum



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

5 &lt;222&gt; (1)..(729)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 5

atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg 48  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15

15

atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96  
 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30

20

gcg ctg tgg ttt ctg gac gca gcg gcg cat ccc atc ctg gcg atc gca 144  
 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala  
 35 40 45

25

aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg 192  
 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60

30

cat gac gcg atg cac ggg tcg gtg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat 240  
 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80

gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg 288  
 Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95

35

cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc 336  
 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110

40

gac gac gac ccc gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc 384  
 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
 115 120 125

45

cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc 432  
 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

50

gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctt ggg gat cgc tgg atg tac 480  
 Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

gtg gtc ttc tgg ccg ctg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc 528  
 Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
 165 170 175

5      gtg ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg      576  
       Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
               180                        185                        190

10     gac cgc cac aat gcg cgg tgc tgc cgg atc agc gac ccc gtg tgc ctg      624  
       Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
               195                        200                        205

15     ctg acc tgc ttt cac ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac      672  
       Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
               210                        215                        220

20     ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac      720  
       Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
               225                        230                        235                        240

25     acc gca tga      729  
       Thr Ala

30     <210> 6

35     <211> 242

40     <212> PRT

45     <213> Agrobacterium aurantiacum

50     <400> 6

55     Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
       1                        5                        10                        15

60     Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
       20                        25                        30

65     Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala  
       35                        40                        45

70     Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
       50                        55                        60

75     His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
       65                        70                        75                        80

12

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

5 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 110

10 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
115 120 125

15 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

20 Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
165 170 175

25 Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
180 185 190

30 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
195 200 205

35 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
225 230 235 240

40 Thr Ala

45 <210> 7

<211> 1631

<212> DNA

50 <213> Alcaligenes sp.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

5 &lt;222&gt; (99)..(827)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 7

ctgcaggccg ggcccgggtgg ccaatgggtcg caaccggcag gactggaaca ggacggcggg 60

ccggtctagg ctgtcgccct acgcagcagg agtttcgg atg tcc gga cgg aag cct 116  
Met Ser Gly Arg Lys Pro

15

1 5

ggc aca act ggc gac acg atc gtc aat ctc ggt ctg acc gcc gcg atc 164  
Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu Gly Leu Thr Ala Ala Ile  
10 15 20

20

ctg ctg tgc tgg ctg gtc ctg cac gcc ttt acg cta tgg ttg cta gat 212  
Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe Thr Leu Trp Leu Leu Asp  
25 30 35

25

gcg gcc gcg cat ccg ctg ctt gcc gtg ctg tgc ctg gct ggg ctg acc 260  
Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu Cys Leu Ala Gly Leu Thr  
40 45 50

30

tgg ctg tgc gtc ggg ctg ttc atc atc gcg cat gac gca atg cac ggg 308  
Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Ala Met His Gly  
55 60 65 70

35

tcc gtg gtg ccg ggg cgg ccg cgc gcc aat gcg gcg atc ggg caa ctg 356  
Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ala Ile Gly Gln Leu  
75 80 85

40

gcg ctg tgg ctc tat gcg ggg ttc tgc tgg ccc aag ctg atc gcc aag 404  
Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Pro Lys Leu Ile Ala Lys  
90 95 100

45

cac atg acg cat cac cgg cac gcc ggc acc gac aac gat ccc gat ttc 452  
His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asn Asp Pro Asp Phe  
105 110 115

50

ggt cac gga ggg ccc gtg cgc tgg tac ggc agc ttc gtc tcc acc tat 500  
Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly Ser Phe Val Ser Thr Tyr  
120 125 130ttc ggc tgg cga gag gga ctg ctg cta ccg gtg atc gtc acc acc tat 548  
Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Thr Tyr  
135 140 145 150

gcg ctg atc ctg ggc gat cgc tgg atg tat gtc atc ttc tgg ccg gtc 596

## 14

	Ala	Leu	Ile	Leu	Gly	Asp	Arg	Trp	Met	Tyr	Val	Ile	Phe	Trp	Pro	Val	
				155						160					165		
	ccg	gcc	gtt	ctg	gcg	tcg	atc	cag	att	ttc	gtc	ttc	gga	act	tgg	ctg	644
5	Pro	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Ile	Gln	Ile	Phe	Val	Phe	Gly	Thr	Trp	Leu	
				170				175						180			
	ccc	cac	cgc	ccg	gga	cat	gac	gat	ttt	ccc	gac	cgg	cac	aac	gcg	agg	692
10	Pro	His	Arg	Pro	Gly	His	Asp	Asp	Phe	Pro	Asp	Arg	His	Asn	Ala	Arg	
				185				190						195			
	tcg	acc	ggc	atc	ggc	gac	ccg	ttg	tca	cta	ctg	acc	tgc	ttc	cat	ttc	740
	Ser	Thr	Gly	Ile	Gly	Asp	Pro	Leu	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Phe	His	Phe	
			200				205					210					
15	ggc	ggc	tat	cac	cac	gaa	cat	cac	ctg	cat	ccg	cat	gtg	ccg	tgg	tgg	788
	Gly	Gly	Tyr	His	His	Glu	His	His	Leu	His	Pro	His	Val	Pro	Trp	Trp	
	215					220					225				230		
20	cgc	ctg	cct	cgt	aca	cgc	aag	acc	gga	ggc	cgc	gca	tga	cgcaattcct			837
	Arg	Leu	Pro	Arg	Thr	Arg	Lys	Thr	Gly	Gly	Arg	Ala					
					235						240						
	cattgtcgtg	gcgacagtcc	tcgtgatgga	gctgaccgcc	tattccgtcc	accgctggat											897
25	tatgcacggc	cccctaggct	ggggctggca	caagtcccat	cacgaagagc	acgaccacgc											957
	gttggagaag	aacgacctct	acggcgctcgt	cttcgcgggtg	ctggcgacga	tcctcttcac											1017
30	cgtgggcgcc	tattggtggc	cggtgctgtg	gtggatcgcc	ctgggcatga	cggtctatgg											1077
	gttgatctat	ttcatcctgc	acgacgggct	tgtgcatcaa	cgctggccgt	ttcggtatat											1137
	tccgcggcgg	ggctatttcc	gcaggctcta	ccaagctcat	cgctgcacc	acgcggtcga											1197
35	ggggcgggac	cactgcgtca	gcttcggctt	catctatgcc	ccacccgtgg	acaagctgaa											1257
	gcaggatctg	aagcggtcgg	gtgtcctgcg	ccccaggac	gagcgtccgt	cgtgatctct											1317
40	gatccccggc	tggccgcgat	aaatccgacg	tgctgctggc	aggggcccggc	cttgccaacg											1377
	gactgatcgc	gctggcgatc	cgcaaggcgc	ggccccgacct	tcgcgtgctg	ctgctggacc											1437
	gtgcggcggg	cgctcggac	gggcatactt	ggtcctgcca	cgacaccgat	ttggcgccgc											1497
45	actggctgga	ccgcctgaag	ccgatcaggc	gtggcgactg	gcccgatcag	gaggtgcggt											1557
	tcccagacca	ttcgcgaagg	ctccgggccc	gatatggctc	gatcgacggg	cgggggctga											1617
50	tgcgtgcggt	gacc															1631

&lt;211&gt; 242

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Alcaligenes sp.

&lt;400&gt; 8

10

Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu  
 1 5 10 15

15

Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe  
 20 25 30

20

Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu  
 35 40 45

25

Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80

30

Ala Ala Ile Gly Gln Leu Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95

35

Pro Lys Leu Ile Ala Lys His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110

40

Asp Asn Asp Pro Asp Phe Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly  
 115 120 125

45

Ser Phe Val Ser Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

Val Ile Val Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

50

Val Ile Phe Trp Pro Val Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe  
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro  
 180 185 190

5 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu  
 195 200 205

10 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

15 Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly  
 225 230 235 240

Arg Ala

20 <210> 9.

<211> 729

25 <212> DNA

<213> Paracoccus marcusii

30 <220>

<221> CDS

35 <222> (1) .. (729)

<223>

40 <400> 9

atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc aca agc ctg 48  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15

45 atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gca tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96  
 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30

50 gcg ctg tgg ttt ctg gac gcg gcg gcc cat ccc atc ctg gcg gtc gcg 144  
 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala  
 35 40 45

aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg 192

17

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
50 55 60

	cat gac gcg atg cac ggg tgc gtc gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat	240
5	His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn 65                      70                      75                      80	
	gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg	288
10	Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp 85                      90                      95	
	cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc	336
15	Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr 100                      105                      110	
	gac gac gac cca gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc	384
20	Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala 115                      120                      125	
	cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc	432
25	Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro 130                      135                      140	
	gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctg ggg gat cgc tgg atg tac	480
30	Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr 145                      150                      155                      160	
	gtg gtc ttc tgg ccg ttg ccg tgc atc ctg gcg tgc atc cag ctg ttc	528
35	Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe 165                      170                      175	
	gtg ttc ggc act tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg	576
40	Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro 180                      185                      190	
	gac cgc cat aat gcg cgg tgc tgc cgg atc agc gac cct gtg tgc ctg	624
45	Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu 195                      200                      205	
	ctg acc tgc ttt cat ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac	672
50	Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His 210                      215                      220	
	ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac	720
55	Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp 225                      230                      235                      240	
	acc gca tga	729
60	Thr Ala	

<210> 10



&lt;211&gt; 242

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Paracoccus marcusii

&lt;400&gt; 10

10

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15

15 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30

20 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala  
 35 40 45

25 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80

30 Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95

35 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110

40 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
 115 120 125

45 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

50 Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
 180 185 190

5 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
 195 200 205

10 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

15 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240

Thr Ala

20 <210> 11

<211> 1629

25 <212> DNA

<213> Synechococcus sp.

30 <220>

<221> CDS

35 <222> (1)..(1629)

<223>

40 <400> 11

atg atc acc acc gat gtt gtc att att ggg gcg ggg cac aat ggc tta 48  
 Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
 1 5 10 15

45 gtc tgt gca gcc tat ttg ctc caa cgg ggc ttg ggg gtg acg tta cta 96  
 Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
 20 25 30

50 gaa aag cgg gaa gta cca ggg ggg gcg gcc acc aca gaa gct ctc atg 144  
 Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met  
 35 40 45

ccg gag cta tcc ccc cag ttt cgc ttt aac cgc tgt gcc att gac cac 192

## 20

	Pro	Glu	Leu	Ser	Pro	Gln	Phe	Arg	Phe	Asn	Arg	Cys	Ala	Ile	Asp	His	
	50						55					60					
5	gaa ttt atc ttt ctg ggg ccg gtg ttg cag gag cta aat tta gcc cag																240
	Glu	Phe	Ile	Phe	Leu	Gly	Pro	Val	Leu	Gln	Glu	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	
	65					70					75				80		
10	tat ggt ttg gaa tat tta ttt tgt gac ccc agt gtt ttt tgt ccg ggg																288
	Tyr	Gly	Leu	Glu	Tyr	Leu	Phe	Cys	Asp	Pro	Ser	Val	Phe	Cys	Pro	Gly	
					85					90					95		
15	ctg gat ggc caa gct ttt atg agc tac cgt tcc cta gaa aaa acc tgt																336
	Leu	Asp	Gly	Gln	Ala	Phe	Met	Ser	Tyr	Arg	Ser	Leu	Glu	Lys	Thr	Cys	
					100					105					110		
20	gcc cac att gcc acc tat agc ccc cga gat gcg gaa aaa tat cgg caa																384
	Ala	His	Ile	Ala	Thr	Tyr	Ser	Pro	Arg	Asp	Ala	Glu	Lys	Tyr	Arg	Gln	
					115					120					125		
25	ttt gtc aat tat tgg acg gat ttg ctc aac gct gtc cag cct gct ttt																432
	Phe	Val	Asn	Tyr	Trp	Thr	Asp	Leu	Leu	Asn	Ala	Val	Gln	Pro	Ala	Phe	
					130					135					140		
30	aat gct ccg ccc cag gct tta cta gat tta gcc ctg aac tat ggt tgg																480
	Asn	Ala	Pro	Pro	Gln	Ala	Leu	Leu	Asp	Leu	Ala	Leu	Asn	Tyr	Gly	Trp	
					145					150					155	160	
35	gaa aac tta aaa tcc gtg ctg gcg atc gcc ggg tcg aaa acc aag gcg																528
	Glu	Asn	Leu	Lys	Ser	Val	Leu	Ala	Ile	Ala	Gly	Ser	Lys	Thr	Lys	Ala	
					165					170					175		
40	ttg gat ttt atc cgc act atg atc ggc tcc ccg gaa gat gtg ctc aat																576
	Leu	Asp	Phe	Ile	Arg	Thr	Met	Ile	Gly	Ser	Pro	Glu	Asp	Val	Leu	Asn	
					180					185					190		
45	gaa tgg ttc gac agc gaa cgg gtt aaa gct cct tta gct aga cta tgt																624
	Glu	Trp	Phe	Asp	Ser	Glu	Arg	Val	Lys	Ala	Pro	Leu	Ala	Arg	Leu	Cys	
					195					200					205		
50	tcg gaa att ggc gct ccc cca tcc caa aag ggt agt agc tcc ggc atg																672
	Ser	Glu	Ile	Gly	Ala	Pro	Pro	Ser	Gln	Lys	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Met	
					210					215					220		
55	atg atg gtg gcc atg cgg cat ttg gag gga att gcc aga cca aaa gga																720
	Met	Met	Val	Ala	Met	Arg	His	Leu	Glu	Gly	Ile	Ala	Arg	Pro	Lys	Gly	
					225					230					235	240	
60	ggc act gga gcc ctc aca gaa gcc ttg gtg aag tta gtg caa gcc caa																768
	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Ala	Leu	Val	Lys	Leu	Val	Gln	Ala	Gln	
					245					250					255		
65	ggg gga aaa atc ctc act gac caa acc gtc aaa cgg gta ttg gtg gaa																816
	Gly	Gly	Lys	Ile	Leu	Thr	Asp	Gln	Thr	Val	Lys	Arg	Val	Leu	Val	Glu	
					260					265					270		

	aac aac cag gcg atc ggg gtg gag gta gct aac gga gaa cag tac cgg Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg 275 280 285	864
5	gcc aaa aaa ggc gtg att tct aac atc gat gcc cgc cgt tta ttt ttg Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu 290 295 300	912
10	caa ttg gtg gaa ccg ggg gcc cta gcc aag gtg aat caa aac cta ggg Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly 305 310 315 320	960
15	gaa cga ctg gaa cgg cgc act gtg aac aat aac gaa gcc att tta aaa Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys 325 330 335	1008
20	atc gat tgt gcc ctc tcc ggt tta ccc cac ttc act gcc atg gcc ggg Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly 340 345 350	1056
	ccg gag gat cta acg gga act att ttg att gcc gac tcg gta cgc cat Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His 355 360 365	1104
25	gtc gag gaa gcc cac gcc ctc att gcc ttg ggg caa att ccc gat gct Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala 370 375 380	1152
30	aat ccg tct tta tat ttg gat att ccc act gta ttg gac ccc acc atg Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met 385 390 395 400	1200
35	gcc ccc cct ggg cag cac acc ctc tgg atc gaa ttt ttt gcc ccc tac Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr 405 410 415	1248
40	cgc atc gcc ggg ttg gaa ggg aca ggg tta atg ggc aca ggt tgg acc Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr 420 425 430	1296
	gat gag tta aag gaa aaa gtg gcg gat cgg gtg att gat aaa tta acg Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr 435 440 445	1344
45	gac tat gcc cct aac cta aaa tct ctg atc att ggt cgc cga gtg gaa Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu 450 455 460	1392
50	agt ccc gcc gaa ctg gcc caa cgg ctg gga agt tac aac ggc aat gtc Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val 465 470 475 480	1440
	tat cat ctg gat atg agt ttg gac caa atg atg ttc ctc cgg cct cta	1488

Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu  
 485 490 495

5 ccg gaa att gcc aac tac caa acc ccc atc aaa aat ctt tac tta aca 1536  
 Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr  
 500 505 510

10 ggg gcg ggt acc cat ccc ggt ggc tcc ata tca ggt atg ccc ggt aga 1584  
 Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg  
 515 520 525

15 aat tgc gct cgg gtc ttt tta aaa caa caa cgt cgt ttt tgg taa 1629  
 Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp  
 530 535 540

<210> 12

20 <211> 542  
 <212> PRT  
 <213> Synechococcus sp.

25 <400> 12

30 Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
 1 5 10 15

35 Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
 20 25 30

Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met  
 35 40 45

40 Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His  
 50 55 60

45 Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln  
 65 70 75 80

50 Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly  
 85 90 95

Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys  
 100 105 110

	Ala	His	Ile	Ala	Thr	Tyr	Ser	Pro	Arg	Asp	Ala	Glu	Lys	Tyr	Arg	Gln	
				115													120
5																	125
	Phe	Val	Asn	Tyr	Trp	Thr	Asp	Leu	Leu	Asn	Ala	Val	Gln	Pro	Ala	Phe	
								130									135
																	140
10	Asn	Ala	Pro	Pro	Gln	Ala	Leu	Leu	Asp	Leu	Ala	Leu	Asn	Tyr	Gly	Trp	
																	145
																	150
																	155
																	160
15	Glu	Asn	Leu	Lys	Ser	Val	Leu	Ala	Ile	Ala	Gly	Ser	Lys	Thr	Lys	Ala	
																	165
																	170
																	175
20	Leu	Asp	Phe	Ile	Arg	Thr	Met	Ile	Gly	Ser	Pro	Glu	Asp	Val	Leu	Asn	
																	180
																	185
																	190
	Glu	Trp	Phe	Asp	Ser	Glu	Arg	Val	Lys	Ala	Pro	Leu	Ala	Arg	Leu	Cys	
																	195
																	200
																	205
25	Ser	Glu	Ile	Gly	Ala	Pro	Pro	Ser	Gln	Lys	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Met	
																	210
																	215
																	220
30	Met	Met	Val	Ala	Met	Arg	His	Leu	Glu	Gly	Ile	Ala	Arg	Pro	Lys	Gly	
																	225
																	230
																	235
																	240
35	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Ala	Leu	Val	Lys	Leu	Val	Gln	Ala	Gln	
																	245
																	250
																	255
40	Gly	Gly	Lys	Ile	Leu	Thr	Asp	Gln	Thr	Val	Lys	Arg	Val	Leu	Val	Glu	
																	260
																	265
																	270
45	Asn	Asn	Gln	Ala	Ile	Gly	Val	Glu	Val	Ala	Asn	Gly	Glu	Gln	Tyr	Arg	
																	275
																	280
																	285
	Ala	Lys	Lys	Gly	Val	Ile	Ser	Asn	Ile	Asp	Ala	Arg					

	Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys	
	325	330 335
5	Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly	
	340	345 350
10	Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His	
	355	360 365
15	Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala	
	370	375 380
20	Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met	
	385	390 395 400
25	Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr	
	405	410 415
30	Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr	
	420	425 430
35	Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr	
	435	440 445
40	Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu	
	450	455 460
45	Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val	
	465	470 475 480
50	Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu	
	485	490 495
55	Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr	
	500	505 510
60	Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg	
	515	520 525
65	Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp	
	530	535 540

<210> 13  
 5 <211> 776  
 <212> DNA  
 <213> Bradyrhizobium sp.  
 10  
 <220>  
 15 <221> CDS  
 <222> (1)..(774)  
 <223>  
 20  
 <400> 13  
 atg cat gca gca acc gcc aag gct act gag ttc ggg gcc tct cgg cgc 48  
 25 Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg  
 1 5 10 15  
 gac gat gcg agg cag cgc cgc gtc ggt ctc acg ctg gcc gcg gtc atc 96  
 30 Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile  
 20 25 30  
 atc gcc gcc tgg ctg gtg ctg cat gtc ggt ctg atg ttc ttc tgg ccg 144  
 Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro  
 35 35 40 45  
 ctg acc ctt cac agc ctg ctg ccg gct ttg cct ctg gtg gtg ctg cag 192  
 Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln  
 50 55 60  
 acc tgg ctc tat gta ggc ctg ttc atc atc gcg cat gac tgc atg cac 240  
 40 Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His  
 65 70 75 80  
 ggc tcg ctg gtg ccg ttc aag ccg cag gtc aac cgc cgt atc gga cag 288  
 45 Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln  
 85 90 95  
 ctc tgc ctg ttc ctc tat gcc ggg ttc tcc ttc gac gct ctc aat gtc 336  
 50 Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val  
 100 105 110  
 gag cac cac aag cat cac cgc cat ccc ggc acg gcc gag gat ccc gat 384  
 Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp  
 115 120 125



	ttc gac gag gtg ccg ccg cac ggc ttc tgg cac tgg ttc gcc agc ttt	432
	Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe	
	130 135 140	
5	ttc ctg cac tat ttc ggc tgg aag cag gtc gcg atc atc gca gcc gtc	480
	Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val	
	145 150 155 160	
10	tcg ctg gtt tat cag ctc gtc ttc gcc gtt ccc ttg cag aac atc ctg	528
	Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu	
	165 170 175	
	ctg ttc tgg gcg ctg ccc ggg ctg ctg tcg gcg ctg cag ctg ttc acc	576
15	Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr	
	180 185 190	
	ttc ggc acc tat ctg ccg cac aag ccg gcc acg cag ccc ttc gcc gat	624
20	Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp	
	195 200 205	
	cgc cac aac gcg cgg acg agc gaa ttt ccc gcg tgg ctg tcg ctg ctg	672
	Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu	
	210 215 220	
25	acc tgc ttc cac ttc ggc ttt cat cac gag cat cat ctg cat ccc gat	720
	Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp	
	225 230 235 240	
30	gcg ccg tgg tgg cgg ctg ccg gag atc aag cgg cgg gcc ctg gaa agg	768
	Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg	
	245 250 255	
	cgt gac ta	776
35	Arg Asp	
	<210> 14	
40	<211> 258	
	<212> PRT	
45	<213> Bradyrhizobium sp.	
	<400> 14	
50	Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg	
	1 5 10 15	

	Asp	Asp	Ala	Arg	Gln	Arg	Arg	Val	Gly	Leu	Thr	Leu	Ala	Ala	Val	Ile	
				20					25						30		
5	Ile	Ala	Ala	Trp	Leu	Val	Leu	His	Val	Gly	Leu	Met	Phe	Phe	Trp	Pro	
			35					40					45				
10	Leu	Thr	Leu	His	Ser	Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Leu	Val	Val	Leu	Gln	
	50						55					60					
15	Thr	Trp	Leu	Tyr	Val	Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Ala	His	Asp	Cys	Met	His	
	65					70					75				80		
20	Gly	Ser	Leu	Val	Pro	Phe	Lys	Pro	Gln	Val	Asn	Arg	Arg	Ile	Gly	Gln	
					85					90					95		
25	Leu	Cys	Leu	Phe	Leu	Tyr	Ala	Gly	Phe	Ser	Phe	Asp	Ala	Leu	Asn	Val	
				100					105					110			
30	Glu	His	His	Lys	His	His	Arg	His	Pro	Gly	Thr	Ala	Glu	Asp	Pro	Asp	
			115					120					125				
35	Phe	Asp	Glu	Val	Pro	Pro	His	Gly	Phe	Trp	His	Trp	Phe	Ala	Ser	Phe	
	130						135					140					
40	Phe	Leu	His	Tyr	Phe	Gly	Trp	Lys	Gln	Val	Ala	Ile	Ile	Ala	Ala	Val	
	145					150					155				160		
45	Ser	Leu	Val	Tyr	Gln	Leu	Val	Phe	Ala	Val	Pro	Leu	Gln	Asn	Ile	Leu	
					165					170				175			
50	Leu	Phe	Trp	Ala	Leu	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Thr	
				180					185					190			
55	Phe	Gly	Thr	Tyr	Leu	Pro	His	Lys	Pro	Ala	Thr	Gln	Pro	Phe	Ala	Asp	
				195				200					205				
60	Arg	His	Asn	Ala	Arg	Thr	Ser	Glu	Phe	Pro	Ala	Trp	Leu	Ser	Leu	Leu	
			210				215					220					
65	Thr	Cys	Phe	His	Phe	Gly	Phe	His	His	Glu	His	His	Leu	His	Pro	Asp	
	225					230					235				240		

Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg  
245 250 255

5 Arg Asp

10 <210> 15  
<211> 777

15 <212> DNA  
<213> Nostoc sp.

20 <220>  
<221> CDS

25 <222> (1)..(777)  
<223>

30 <400> 15  
atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta 48  
Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu  
1 5 10 15

35 ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt 96  
Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
20 25 30

40 att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta 144  
Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu  
35 40 45

45 ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc 192  
Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala  
50 55 60

50 atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat 240  
Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
65 70 75 80

gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat 288  
Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
85 90 95

	ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa	336
	Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys	
	100 105 110	
5	gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat	384
	Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp	
	115 120 125	
10	tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg	432
	Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp	
	130 135 140	
15	tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga	480
	Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly	
	145 150 155 160	
20	tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa	528
	Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu	
	165 170 175	
	aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta	576
	Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val	
	180 185 190	
25	caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt	624
	Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly	
	195 200 205	
30	ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt	672
	Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe	
	210 215 220	
35	tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac	720
	Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His	
	225 230 235 240	
40	gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata	768
	Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile	
	245 250 255	
	tct tta taa	777
	Ser Leu	
45		
	<210> 16	
	<211> 258	
50	<212> PRT	
	<213> Nostoc sp.	

&lt;400&gt; 16

5 Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu  
 1 5 10 15

10 Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
 20 25 30

15 Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu  
 35 40 45

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala  
 50 55 60

20 Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 65 70 75 80

25 Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
 85 90 95

30 Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys  
 100 105 110

35 Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp  
 115 120 125

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp  
 130 135 140

40 Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly  
 145 150 155 160

45 Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu  
 165 170 175

50 Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly  
 195 200 205

Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe  
 210 215 220  
 5

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His  
 225 230 235 240

10

Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
 245 250 255

15 Ser Leu

20

<210> 17  
 <211> 1608  
 <212> DNA

25 <213> Haematococcus pluvialis

30

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (3) .. (971)

35 <223>

40

<400> 17  
 ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc 47  
 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile  
 1 5 10 15

45

ggc cca cct cct cat ctc cat cgg tca ttt gct gct acc acg atg ctg 95  
 Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu  
 20 25 30

50

tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc cgc gtt gaa cta gcc 143  
 Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala  
 35 40 45

cgc gac atc acg cgg ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg 191  
 Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser  
 50 55 60

	tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gcg ctg gga	239
	Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly	
	65 70 75	
5	acc gtg cag gct gcc ggc gcg ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca	287
	Thr Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala	
	80 85 90 95	
10	ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa	335
	Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys	
	100 105 110	
15	cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att ggc	383
	Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly	
	115 120 125	
20	gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac	431
	Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His	
	130 135 140	
25	atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc	479
	Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu	
	145 150 155	
30	ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat	527
	Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr	
	160 165 170 175	
35	gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tcg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac	575
	Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His	
	180 185 190	
40	aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg	623
	Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu	
	195 200 205	
45	ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc	671
	Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly	
	210 215 220	
50	ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg	719
	Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu	
	225 230 235	
55	ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg	767
	Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu	
	240 245 250 255	
60	gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg	815
	Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met	
	260 265 270	
65	aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt	863

## 33

Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly  
 275 280 285

5 ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att 911  
 Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile  
 290 295 300

10 cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg 959  
 Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp  
 305 310 315

15 tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcacgct ggtttcacac ctcatgcctg 1011  
 Ser Lys Arg  
 320

20 tgataagggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacgggtcg actgggtctga 1071  
 tggccaatgg catcgcccat gtctgggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaagggtgatg 1131  
 cacatcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc 1191  
 caggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcggt tgtgaagcaa tgactccgcc 1251  
 25 catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatg gatcatggta 1311  
 gtgcagcaaa ctatattcac ctagggtgtg tggtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg 1371  
 catgatgtac tcgtcatggt gtgttggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc 1431  
 30 agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga 1491  
 ggctcgtgcc agaaatggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga 1551  
 tgcaactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcacaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1608

35 <210> 18  
 <211> 322  
 40 <212> PRT  
 <213> Haematococcus pluvialis

45 <400> 18

50 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser  
 20 25 30



5 Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg  
     35                    40                    45

10 Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu  
     50                    55                    60

15 Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr  
     65                    70                    75                    80

20 Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu  
     85                    90                    95

25 Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg  
     100                    105                    110

30 Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val  
     115                    120                    125

35 Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met  
     130                    135                    140

40 Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu  
     145                    150                    155                    160

45 Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala  
     165                    170                    175

50 His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys  
     180                    185                    190

55 Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe  
     195                    200                    205

60 Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe  
     210                    215                    220

65 Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly  
     225                    230                    235                    240

35

Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val  
 245 250 255

5 His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys  
 260 265 270

10 Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly  
 275 280 285

15 Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro  
 290 295 300

Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser  
 305 310 315 320

20 Lys Arg

25 <210> 19

<211> 1503

<212> DNA

30 <213> Tomato

35 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

40 <223>

45 <400> 19 48  
 atg gat act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca  
 Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro  
 1 5 10 15

50 cat cat ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat 96  
 His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His  
 20 25 30

cat aat ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt 144

	His	Asn	Phe	Gly	Ser	Arg	Lys	Phe	Cys	Glu	Thr	Leu	Gly	Arg	Ser	Val	
		35						40					45				
5	tgt	ggt	aag	ggt	agt	agt	agt	gct	ctt	tta	gag	ctt	gta	cct	gag	acc	192
	Cys	Val	Lys	Gly	Ser	Ser	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu	Leu	Val	Pro	Glu	Thr	
		50					55					60					
10	aaa	aag	gag	aat	ctt	gat	ttt	gag	ctt	cct	atg	tat	gac	cct	tca	aaa	240
	Lys	Lys	Glu	Asn	Leu	Asp	Phe	Glu	Leu	Pro	Met	Tyr	Asp	Pro	Ser	Lys	
	65					70					75				80		
15	ggg	ggt	ggt	gtg	gat	ctt	gct	gtg	ggt	ggt	ggc	cct	gca	gga	ctt		288
	Gly	Val	Val	Val	Asp	Leu	Ala	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	
					85					90					95		
	gct	ggt	gca	cag	caa	ggt	tct	gaa	gca	gga	ctc	tct	ggt	tgt	tca	att	336
	Ala	Val	Ala	Gln	Gln	Val	Ser	Glu	Ala	Gly	Leu	Ser	Val	Cys	Ser	Ile	
				100					105					110			
20	gat	ccg	aat	cct	aaa	ttg	ata	tgg	cct	aat	aac	tat	ggt	ggt	tgg	gtg	384
	Asp	Pro	Asn	Pro	Lys	Leu	Ile	Trp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Val	
			115					120					125				
25	gat	gaa	ttt	gag	gct	atg	gac	ttg	tta	gat	tgt	cta	gat	gct	acc	tgg	432
	Asp	Glu	Phe	Glu	Ala	Met	Asp	Leu	Leu	Asp	Cys	Leu	Asp	Ala	Thr	Trp	
		130					135					140					
30	tct	ggt	gca	gca	gtg	tac	att	gat	gat	aat	acg	gct	aaa	gat	ctt	cat	480
	Ser	Gly	Ala	Ala	Val	Tyr	Ile	Asp	Asp	Asn	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	His	
	145					150					155				160		
35	aga	cct	tat	gga	agg	ggt	aac	cgg	aaa	cag	ctg	aaa	tcg	aaa	atg	atg	528
	Arg	Pro	Tyr	Gly	Arg	Val	Asn	Arg	Lys	Gln	Leu	Lys	Ser	Lys	Met	Met	
				165					170						175		
	cag	aaa	tgt	ata	atg	aat	ggt	ggt	aaa	ttc	cac	caa	gcc	aaa	ggt	ata	576
	Gln	Lys	Cys	Ile	Met	Asn	Gly	Val	Lys	Phe	His	Gln	Ala	Lys	Val	Ile	
				180					185					190			
40	aag	gtg	att	cat	gag	gaa	tcg	aaa	tcc	atg	ttg	ata	tgc	aat	gat	ggt	624
	Lys	Val	Ile	His	Glu	Glu	Ser	Lys	Ser	Met	Leu	Ile	Cys	Asn	Asp	Gly	
			195					200					205				
45	att	act	att	cag	gca	acg	gtg	gtg	ctc	gat	gca	act	ggc	ttc	tct	aga	672
	Ile	Thr	Ile	Gln	Ala	Thr	Val	Val	Leu	Asp	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Arg	
		210					215					220					
50	tct	ctt	ggt	cag	tat	gat	aag	cct	tat	aac	ccc	ggg	tat	caa	ggt	gct	720
	Ser	Leu	Val	Gln	Tyr	Asp	Lys	Pro	Tyr	Asn	Pro	Gly	Tyr	Gln	Val	Ala	
		225				230				235					240		
	tat	ggc	att	ttg	gct	gaa	gtg	gaa	gag	cac	ccc	ttt	gat	gta	aac	aag	768
	Tyr	Gly	Ile	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	His	Pro	Phe	Asp	Val	Asn	Lys	
				245						250					255		

	atg gtt ttc atg gat tgg cga gat tct cat ttg aag aac aat act gat	816
	Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp	
	260 265 270	
5	ctc aag gag aga aat agt aga ata cca act ttt ctt tat gca atg cca	864
	Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro	
	275 280 285	
10	ttt tca tcc aac agg ata ttt ctt gaa gaa aca tca ctc gta gct cgt	912
	Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg	
	290 295 300	
15	cct ggc ttg cgt ata gat gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta	960
	Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu	
	305 310 315 320	
20	aac cat ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt	1008
	Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys	
	325 330 335	
25	cta ata cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt	1056
	Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val	
	340 345 350	
30	gga atc ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg	1104
	Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met	
	355 360 365	
35	gtg gca agg aca cta gct gcg gct cct gtt gtt gcc aat gcc ata att	1152
	Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile	
	370 375 380	
40	caa tac ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca	1200
	Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr	
	385 390 395 400	
45	gct gtt tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag	1248
	Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu	
	405 410 415	
50	ttc ttc tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct	1296
	Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala	
	420 425 430	
55	aca aga agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg	1344
	Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp	
	435 440 445	
60	cat ggc ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt	1392
	His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe	
	450 455 460	
65	ggg ctg tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata	1440

Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile  
 465 470 475 480

5 atg aca aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta 1488  
 Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu  
 485 490 495

10 cag gat aaa gaa tga 1503  
 Gln Asp Lys Glu  
 500

<210> 20

15 <211> 500  
 <212> PRT  
 <213> Tomate

20

<400> 20

25 Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro  
 1 5 10 15

30 His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His  
 20 25 30

35 His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val  
 35 40 45

Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr  
 50 55 60

40 Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys  
 65 70 75 80

45 Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu  
 85 90 95

50 Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile  
 100 105 110

Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val  
 115 120 125

Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp  
 130 135 140  
 5  
 Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His  
 145 150 155 160  
 10  
 Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met  
 165 170 175  
 15  
 Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile  
 180 185 190  
 20  
 Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly  
 195 200 205  
 25  
 Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg  
 210 215 220  
 Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala  
 225 230 235 240  
 30  
 Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys  
 245 250 255  
 35  
 Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp  
 260 265 270  
 40  
 Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro  
 275 280 285  
 45  
 Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg  
 290 295 300  
 Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu  
 305 310 315 320  
 50  
 Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys  
 325 330 335

## 40

Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val  
 340 345 350

5 Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met  
 355 360 365

10 Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile  
 370 375 380

15 Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr  
 385 390 395 400

Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu  
 405 410 415

20 Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala  
 420 425 430

25 Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp  
 435 440 445

30 His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe  
 450 455 460

35 Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile  
 465 470 475 480

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu  
 485 490 495

40 Gln Asp Lys Glu  
 500

45 <210> 21  
 <211> 195  
 <212> DNA

50 <213> Kartoffel

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Intron

5 &lt;222&gt; (1)..(195)

&lt;223&gt;

10

<400> 21  
 tacgtaagtt tctgcttcta cctttgatat atatataata attatcatta attagtagta 60

atataatatt tcaaataattt ttttcaaaat aaaagaatgt agtatatagc aattgctttt 120

15 ctgtagttta taagtgtgta tattttaatt tataactttt ctaatatatg accaaaattt 180

gttgatgtgc agctg 195

20

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 1155

25 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

30

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

35 &lt;222&gt; (6)..(995)

&lt;223&gt;

40

<400> 22  
 gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50  
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser  
 1 5 10 15

45

gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac 98  
 Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp  
 20 25 30

50

gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca 146  
 Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser  
 35 40 45

gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc 194



Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser  
50 55 60

	gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc	242
5	Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala	
	65 70 75	
	gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg	290
10	Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu	
	80 85 90 95	
	gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt	338
	Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val	
	100 105 110	
15	agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg	386
	Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu	
	115 120 125	
20	gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat	434
	Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His	
	130 135 140	
25	ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga	482
	Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg	
	145 150 155	
30	gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc	530
	Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg	
	160 165 170 175	
	aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct	578
	Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro	
	180 185 190	
35	gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc	626
	Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe	
	195 200 205	
40	atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg	674
	Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp	
	210 215 220	
45	acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg	722
	Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val	
	225 230 235	
50	ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt	770
	Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe	
	240 245 250 255	
	ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct	818
	Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser	
	260 265 270	

tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc 866  
 Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser  
 275 280 285

5 gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914  
 Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu  
 290 295 300

10 cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962  
 His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg  
 305 310 315

15 cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc 1015  
 Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 320 325

cctgctgcca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc 1075

20 gctgctgccg gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg 1135  
 tttgtagctg tcgagcttgc 1155

25 <210> 23  
 <211> 329  
 <212> PRT

30 <213> Haematococcus pluvialis

35 <400> 23  
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15

40 Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30

45 Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45

50 Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95  
 5  
 Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
 100 105 110  
 10  
 Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
 115 120 125  
 15  
 Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
 130 135 140  
 20  
 Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160  
 Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175  
 25  
 His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
 180 185 190  
 30  
 Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
 195 200 205  
 35  
 Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
 210 215 220  
 40  
 Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
 225 230 235 240  
 Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
 245 250 255  
 45  
 Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
 260 265 270  
 50  
 Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
 275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290 295 300

5 His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320

10 Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 325

<210> 24

15 <211> 1111

<212> DNA

20 <213> Haematococcus pluvialis

<220>

25 <221> CDS

<222> (4)..(951)

30 <223>

<400> 24

35 tgc atg cta gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc 48  
 Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser  
 1 5 10 15

40 tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa 96  
 Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu  
 20 25 30

45 gag tca gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca 144  
 Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro  
 35 40 45

cct tcc gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc 192  
 Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser  
 50 55 60

50 tgg gcc gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc 240  
 Trp Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr  
 65 70 75

tcc ttg gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag 288

	Ser	Leu	Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	
	80					85					90					95	
5	ctg	gtt	agc	ggc	agc	agc	agc	ctg	ctg	cac	atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	336
	Leu	Val	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	
				100						105					110		
10	gtc	ctg	gag	ttc	ctg	tac	aca	ggc	ctt	ttt	atc	acc	acg	cat	gat	gct	384
	Val	Leu	Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	
				115					120					125			
15	atg	cat	ggc	acc	atc	gcc	atg	aga	aac	agg	cag	ctt	aat	gac	ttc	ttg	432
	Met	His	Gly	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	
				130					135				140				
20	ggc	aga	gta	tgc	atc	tcc	ttg	tac	gcc	tgg	ttt	gat	tac	aac	atg	ctg	480
	Gly	Arg	Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	
				145				150				155					
25	cac	cgc	aag	cat	tgg	gag	cac	cac	aac	cac	act	ggc	gag	gtg	ggc	aag	528
	His	Arg	Lys	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	
						160		165			170				175		
30	gac	cct	gac	ttc	cac	agg	gga	aac	cct	ggc	att	gtg	ccc	tgg	ttt	gcc	576
	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	
					180					185					190		
35	agc	ttc	atg	tcc	agc	tac	atg	tgc	atg	tgg	cag	ttt	gcg	cgc	ctc	gca	624
	Ser	Phe	Met	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	
				195					200					205			
40	tgg	tgg	acg	gtg	gtc	atg	cag	ctg	ctg	ggc	gcg	cca	atg	gcg	aac	ctg	672
	Trp	Trp	Thr	Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu	
				210				215					220				
45	ctg	gtg	ttc	atg	gcg	gcc	gcg	ccc	atc	ctg	tcc	gcc	ttc	cgc	ttg	ttc	720
	Leu	Val	Phe	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	
				225				230				235					
50	tac	ttt	ggc	acg	tac	atg	ccc	cac	aag	cct	gag	cct	ggc	gcc	gcg	tca	768
	Tyr	Phe	Gly	Thr	Tyr	Met	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	
						240		245			250				255		
55	ggc	tct	tca	cca	gcc	gtc	atg	aac	tgg	tgg	aag	tcg	cgc	act	agc	cag	816
	Gly	Ser	Ser	Pro	Ala	Val	Met	Asn	Trp	Trp	Lys	Ser	Arg	Thr	Ser	Gln	
					260				265					270			
60	gcg	tcc	gac	ctg	gtc	agc	ttt	ctg	acc	tgc	tac	cac	ttc	gac	ctg	cac	864
	Ala	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Asp	Leu	His	
				275				280					285				
65	tgg	gag	cac	cac	cgc	tgg	ccc	ttc	gcc	ccc	tgg	tgg	gag	ctg	ccc	aac	912
	Trp	Glu	His	His	Arg	Trp	Pro	Phe	Ala	Pro	Trp	Trp	Glu	Leu	Pro	Asn	
				290				295					300				

tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac 961  
 Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 305 310 315

5 tgcagtgggc cctgctgcca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa 1021  
 agctgcaggc gctgctgccg gacacgttgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta 1081

10 ggggagggggg tttgtagctg tcgagcttgc 1111

<210> 25

15 <211> 315  
 <212> PRT  
 <213> Haematococcus pluvialis

20

<400> 25

25 Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser  
 1 5 10 15

30 Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu  
 20 25 30

35 Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro  
 35 40 45

Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp  
 50 55 60

40 Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser  
 65 70 75 80

45 Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu  
 85 90 95

50 Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val  
 100 105 110

Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met  
 115 120 125

His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly  
 130 135 140  
 5  
 Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His  
 145 150 155 160  
 10  
 Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp  
 165 170 175  
 15 Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser  
 180 185 190  
 20 Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp  
 195 200 205  
 25 Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu  
 210 215 220  
 Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr  
 225 230 235 240  
 30 Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly  
 245 250 255  
 35 Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala  
 260 265 270  
 40 Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp  
 275 280 285  
 45 Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys  
 290 295 300  
 Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 305 310 315  
 50  
 <210> 26  
 <211> 1031

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

10

&lt;222&gt; (6)..(1031)

&lt;223&gt;

15

&lt;400&gt; 26

	gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc	50
	Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser	
20	1 5 10 15	
	gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac	98
	Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp	
	20 25 30	
25	gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca	146
	Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser	
	35 40 45	
30	gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc	194
	Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser	
	50 55 60	
35	gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gct	242
	Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala	
	65 70 75	
40	gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg	290
	Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu	
	80 85 90 95	
	gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt	338
	Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val	
	100 105 110	
45	agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg	386
	Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu	
	115 120 125	
50	gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat	434
	Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His	
	130 135 140	
	ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga	482



	Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg	
	145 150 155	
5	gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg	530
	160 165 170 175	
10	aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro	578
	180 185 190	
15	gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe	626
	195 200 205	
20	atg tcc agc tac atg tgc atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp	674
	210 215 220	
25	acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val	722
	225 230 235	
30	ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe	770
	240 245 250 255	
35	ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser	818
	260 265 270	
40	tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tgc cgc act agc cag gcg tcc Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser	866
	275 280 285	
45	gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu	914
	290 295 300	
50	cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg	962
	305 310 315	
55	cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc gag caa aaa ctc atc tca Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser	1010
	320 325 330 335	
60	gaa gag gat ctg aat agc tag Glu Glu Asp Leu Asn Ser	1031
	340	

&lt;211&gt; 341

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;400&gt; 27

10

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15

15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30

20

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45

25

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80

30

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95

35

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
 100 105 110

40

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
 115 120 125

45

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
 130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160

50

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175

	His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp	
	180	185 190
5	Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met	
	195	200 205
10	Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr	
	210	215 220
15	Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe	
	225	230 235 240
	Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly	
		245 250 255
20	Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser	
		260 265 270
25	Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp	
		275 280 285
30	Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His	
		290 295 300
35	His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg	
		305 310 315 320
	Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu	
		325 330 335
40	Glu Asp Leu Asn Ser	
		340
45	<210> 28	
	<211> 777	
	<212> DNA	
50	<213> Arabidopsis thaliana	

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

5 &lt;222&gt; (1)..(777)

&lt;223&gt;

10

<400> 28  
gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt 60  
tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactggtcga 120  
15 agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga 180  
ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tctaacttg tgattccttc ttaaacccta 240  
20 ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaggc aaatccggga aattattgta 300  
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca 360  
tatatatctc tttctttctta tttcccaa ataacagacaa aagtagaata ttggctttta 420  
25 acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgca 480  
aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt 540  
30 ccgttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta 600  
tcacttagtt ttcacaaact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt 660  
tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact 720  
35 tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaata tcttcaacaa aaagctt 777

40

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

45

&lt;213&gt; kuenstlich

50

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(22)

&lt;223&gt;

5 <400> 29  
gcaagctcga cagctacaaa cc

22

10 <210> 30

<211> 24

<212> DNA

15 <213> kuenstlich

<220>

20 <221> primer\_bind

<222> (1)..(24)

25 <223>

30 <400> 30  
gaagcatgca gctagcagcg acag

24

<210> 31

35 <211> 30

<212> DNA

<213> kuenstlich

40

<220>

45 <221> primer\_bind

<222> (1)..(30)

<223>

50

<400> 31  
tgcattgctag aggcactcaa ggagaaggag

30

<210> 32  
5 <211> 59  
<212> DNA  
<213> kuenstlich  
10  
<220>  
15 <221> primer\_bind  
<222> (1)..(59)  
<223>  
20  
<400> 32  
ctagctattc agatcctctt ctgagatgag tttttgctcg gcaggaacca gacctcggc 59  
25  
<210> 33  
<211> 28  
30 <212> DNA  
<213> kuenstlich  
35  
<220>  
<221> primer\_bind  
40 <222> (1)..(28)  
<223>  
45  
<400> 33  
gagctcactc actgatttcc attgcttg 28  
50  
<210> 34  
<211> 37

<212> DNA

<213> kuenstlich

5

<220>

<221> primer\_bind

10

<222> (1) .. (37)

<223>

15

<400> 34  
cgccggttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

20

<210> 35

<211> 34

25

<212> DNA

<213> kuenstlich

30

<220>

<221> primer\_bind

35

<222> (1) .. (34)

<223>

40

<400> 35  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

45

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

50

<213> kuenstlich

<220>  
 <221> primer\_bind  
 5 <222> (1)..(25)  
 <223>  
 10  
 <400> 36  
 taagctttttt gttgaagaga tttgg 25  
 15 <210> 37  
 <211> 212  
 <212> DNA  
 20 <213> Kuenstliche Sequenz  
 25 <220>  
 <221> Intron  
 <222> (1)..(212)  
 30 <223>  
 35 <400> 37  
 gtcgactacg taagtttctg cttctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta 60  
 gtagtaatat aatatttcaa atattttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 120  
 40 gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca 180  
 aaatttggtg atgtgcaggt atcaccggat cc 212  
 45 <210> 38  
 <211> 1830  
 <212> DNA  
 50 <213> Tagetes erecta



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

5 &lt;222&gt; (141)..(1691)

&lt;223&gt;

10

<400> 38  
 ggcacgaggg aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttgttga gagacactcc aatccaaaca 60

gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120

15

agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173  
 Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr  
 1 5 10

20

atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg 221  
 Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr  
 15 20 25

25

aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa 269  
 Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln  
 30 35 40

30

gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tcg gag ctg 317  
 Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu  
 45 50 55

35

ctt ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc 365  
 Leu Phe Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser  
 60 65 70 75

cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gga gac agt 413  
 Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser  
 80 85 90

40

aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt 461  
 Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu  
 95 100 105

45

gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc 509  
 Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile  
 110 115 120

50

ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa 557  
 Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu  
 125 130 135

ttt ata ggt ctt gga ctt gag ggc tgt att gaa cat gtt tgg cga gat 605  
 Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp  
 140 145 150 155

	act gta gta tat ctt gat gac aac gat ccc att ctc ata ggt cgt gcc	653
	Thr Val Val Tyr Leu Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala	
	160 165 170	
5	tat gga cga gtt agt cgt gat tta ctt cac gag gag ttg ttg act agg	701
	Tyr Gly Arg Val Ser Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg	
	175 180 185	
10	tgc atg gag tca ggc gtt tca tat ctg agc tcc aaa gtg gaa cgg att	749
	Cys Met Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile	
	190 195 200	
15	act gaa gct cca aat ggc cta agt ctc ata gag tgt gaa ggc aat atc	797
	Thr Glu Ala Pro Asn Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile	
	205 210 215	
20	aca att cca tgc agg ctt gct act gtc gct tct gga gca gct tct gga	845
	Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly	
	220 225 230 235	
	aaa ctt ttg cag tat gaa ctt ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca	893
	Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr	
	240 245 250	
25	gct tat ggt ata gag gtt gag gtt gaa agc ata ccc tat gat cca agc	941
	Ala Tyr Gly Ile Glu Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser	
	255 260 265	
30	cta atg gtt ttc atg gat tat aga gac tac acc aaa cat aaa tct caa	989
	Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln	
	270 275 280	
35	tca cta gaa gca caa tat cca aca ttt ttg tat gtc atg cca atg tct	1037
	Ser Leu Glu Ala Gln Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser	
	285 290 295	
40	cca act aaa gta ttc ttt gag gaa act tgt ttg gct tca aaa gag gcc	1085
	Pro Thr Lys Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala	
	300 305 310 315	
	atg cct ttt gag tta ttg aag aca aaa ctc atg tca aga tta aag act	1133
	Met Pro Phe Glu Leu Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr	
	320 325 330	
45	atg ggg atc cga ata acc aaa act tat gaa gag gaa tgg tca tat att	1181
	Met Gly Ile Arg Ile Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile	
	335 340 345	
50	cca gta ggt gga tcc tta cca aat acc gag caa aag aac ctt gca ttt	1229
	Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe	
	350 355 360	
	ggg gct gct gct gct agc atg gtg cat cca gcc aca gga tat tcg gtt gta	1277

60

	Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val	
	365 370 375	
5	aga tca ctg tca gaa gct cct aat tat gca gca gta att gca aag att Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile	1325
	380 385 390 395	
10	tta ggg aaa gga aat tca aaa cag atg ctt gat cat gga aga tac aca Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr	1373
	400 405 410	
15	acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt gaa agg Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg	1421
	415 420 425	
20	aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att gtc cag Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln	1469
	430 435 440	
25	atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc cgc ttg Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu	1517
	445 450 455	
30	ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tgg tta tca tca act Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr	1565
	460 465 470 475	
35	gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser	1613
	480 485 490	
40	ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly	1661
	495 500 505	
45	aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taa ataactctag tcgcgatcag Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile	1711
	510 515	
50	tttagattat aggcacatct tgcataatata tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcattaa ttgtattttct tggggtaatg ctgatgaagt attttctgg	1771 1830
	<210> 39	
	<211> 516	
	<212> PRT	
	<213> Tagetes erecta	

&lt;400&gt; 39

5 Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys  
 20 25 30  
 10 Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu  
 35 40 45  
 15 Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met  
 50 55 60  
 20 Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp  
 85 90 95  
 25 Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu  
 100 105 110  
 30 Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro  
 115 120 125  
 35 Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly  
 130 135 140  
 40 Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu  
 145 150 155 160  
 Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser  
 165 170 175  
 45 Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly  
 180 185 190  
 50 Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn  
 195 200 205

Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg  
 210 215 220

5 Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr  
 225 230 235 240

10 Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu  
 245 250 255

15 Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met  
 260 265 270

Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln  
 275 280 285

20 Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe  
 290 295 300

25 Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu  
 305 310 315 320

30 Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile  
 325 330 335

35 Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser  
 340 345 350

Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser  
 355 360 365

40 Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu  
 370 375 380

45 Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn  
 385 390 395 400

50 Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys  
 405 410 415

Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala  
 420 425 430

Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly  
 435 440 445  
 5

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp  
 450 455 460

10 Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe  
 465 470 475 480

15 Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu  
 485 490 495

20 Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala  
 500 505 510

Tyr Leu Thr Ile  
 515

25

<210> 40

<211> 445

30 <212> DNA

<213> Tagetes erecta

35

<220>

<221> Sense Fragment

40 <222> (1)..(445)

<223>

45

<400> 40  
 aagcttgac gaggcaaagc aaaggttggt tgttggtggt gttgagagac actccaatcc 60

50 aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa 120

gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180

ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240

	caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt	300
	gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaatgcaa cagaataagt ccatggatgc	360
5	acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa	420
	ctgtatactg gatttggttg tcgac	445
10	<210> 41	
	<211> 446	
15	<212> DNA	
	<213> Tagetes erecta	
20	<220>	
	<221> Antisense Fragment	
25	<222> (1)..(446)	
	<223>	
30	<400> 41	
	gaattcgcac gaggcaaagc aaagggtggt tggtggtggt gttgagagac actccaatcc	60
	aaacagatac aaggcgtgac tggatatattc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa	120
35	gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat	180
	ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg	240
40	caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt	300
	gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaatgcaa cagaataagt ccatggatgc	360
	acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa	420
45	ctgtatactg gatttggttg gacct	446
	<210> 42	
50	<211> 393	
	<212> DNA	

<213> *Tagetes erecta*

5 <220>

<221> Sense Fragment

<222> (1) .. (393)

10

<223>

15 <400> 42  
aagctttgga ttagcactga ttgtccagat ggatattgag gggacccgca cattcttccg 60  
gactttcttc cgcttgccca catggatgtg gtggggggtt cttggatctt cgttatcatc 120  
20 aactgacttg ataatatattg cgttttacat gtttatcata gcaccgcata gcctgagaat 180  
gggtctgggtt agacatttgc tttctgaccc gacaggagga acaatgttaa aagcgtatct 240  
cacgatataa ataactctag tcgcgatcag tttagattat aggcacatct tgcatatata 300  
25 tatgtataaa ctttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct 360  
tggggtaatg ctgatgaagt attttctgtc gac 393

30

<210> 43

<211> 397

35 <212> DNA

<213> *Tagetes erecta*

40

<220>

<221> Antisense Fragment

45 <222> (1) .. (397)

<223>

50

<400> 43  
gaattctctt tggattagca ctgattgtcc agatggatat tgagggggacc cgcacattct 60  
tccggacttt cttccgcttg cccacatgga tgtggtgggg gtttcttgga tcttcgttat 120



catcaactga cttgataata tttgcgtttt acatgtttat catagcaccg catagcctga 180  
 gaatgggtct ggtagacat ttgctttctg acccgacagg aggaacaatg ttaaaagcgt 240  
 5 atctcagcat ataaataact ctagtcgga tcagtttaga ttataggcac atcttgata 300  
 tatatatgta taaaccttat gtgtgctgta tccttacatc aacacagtca ttaattgtat 360  
 10 ttcttgggggt aatgctgatg aagtattttc tggatcc 397  
  
 <210> 44  
 15 <211> 1537  
 <212> DNA  
 <213> -  
 20  
  
 <220>  
 25 <221> promoter  
 <222> (1)..(1537)  
 <223>  
 30  
  
 <400> 44  
 35 gagctctaca aattaggggt actttattca tttcatcca ttctctttat tgttaaattt 60  
 tgtacattta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctcaactttct tattcatacc 120  
 tattcactca agcctttacc atcttctttt tctatttcaa tactatttct acttcatttt 180  
 40 tcacgttttt aacatctttc tttatttctt gtccacttcg tttagggatg cctaattgtcc 240  
 caaatttcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt 300  
 aatacaaata aagtgaaca aaatatctat aaataaaca atatatatat tttgtagac 360  
 45 gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaatttt gttatatttc tactttacct actaaatttg 420  
 tttctcatat ttacctttta acccccacaa aaaaaatta taaaaaagaa agaaaaagc 480  
 50 taaaccctat ttaaataagct aactataaga tcttaaaatt atcctcatca gtgtatagtt 540  
 taattgggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctagctattt 600  
 ctcacatttt ttaacttaag aaaatagtca taacatagtc taaaattcaa acatccacat 660

gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tattttattta aataaaaaag actaataaat 720  
 atataaaatg aatgttcata cgcagaccca tttagagatg agtatgcttt cacatgctga 780  
 5 gattattttc aaaactaagg ttgtagcaat attaaatcaa taaaattatt ataaataaca 840  
 aaattaacct gctcgtgttt gctgtatatg ggaggctaca aaataaatta aactaaagat 900  
 10 gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attagtttat acatattaat tcaggagctg 960  
 cacaacccaa ttctattttc gttccttggg ggctgggttt ctcaacagg tcaatagtca 1020  
 atattagggt ttattggact tttaatagta tcaaacaaat ctatgtgtga acttaaaaat 1080  
 15 tgtattaaat atttagggta acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttaataca 1140  
 cgaaagcgta ttgtgtattc attcatttgg cgctcacat gcttcggttg gctcgtttta 1200  
 20 gtctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctcttccta tgccacgtgt tctgagctta 1260  
 acaagccacg ttgcgtgcc a ttgccaaaca agtcatttta acttcacaag gtccgatttg 1320  
 acctcaaaa caacgacaag tttccgaaca gtcgcaaga tcaagggtat aatcgtcttt 1380  
 25 ttgaattcta tttctcttta tttaatagtc cctctcgtgt gatagttttt aaaagatttt 1440  
 taaaacgtag ctgctgttta agtaaatccc agtccttcag tttgtgcttt tgtgtgtttt 1500  
 30 gtttctctga tttacggaat ttggaaataa taagctt 1537

<210> 45

35 <211> 734

<212> DNA

40 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

45 <221> variation

<222> (1)..(734)

<223>

50

<400> 45

ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc 60

	cctaggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc	120
	cagctagtcg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cggtaggatcg	180
5	gagctgcttt ttgttcaaat gcaacagaat aagtccatgg atgcacagtc tagcctatcc	240
	caaaagggtca ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgttttt taggaataat	300
10	gatattttaga tagattagct atcacctgtg ctgtggtgtg cagctcccaa ggggtcttacc	360
	gatagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttgggagggtg ggggattata ggctttgttg	420
	tgagaatggt gagaaagagg ttgacaaat cgggtgtttga atgagggttaa atggagttta	480
15	attaaaataa agagaagaga aagattaaga ggggtgatggg gatattaaag acggscaata	540
	tagtgatgcc acgtagaaaa aggtaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct	600
20	tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta	660
	ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttggttg ttgttggtgt tgagagacac tccaatccaa	720
	acagatacaa ggcg	734
25		
	<210> 46	
	<211> 280	
30	<212> DNA	
	<213> kuenstliche Sequenz	
35		
	<220>	
	<221> variation	
40	<222> (1) .. (280)	
	<223>	
45		
	<400> 46	
	gtcgagtatg gagttcaatt aaaataaaga gaagaaaaag attaagaggg tgatggggat	60
50	attaaagacg gccaatrtag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtgaaa acatacaacg	120
	tggttttaaa agatggcttg gctgctaata aactcaactc aactcatatc ctatccattc	180
	aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaagcaaag caaagggtgt ttgttggtgt	240

tggttgagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga

5 <210> 47

<211> 358

<212> DNA

10 <213> Tagetes erecta

15 <220>

<221> Sense Promotor

<222> (1)..(358)

20 <223>

25 <400> 47  
aagcttaccg atagtaaaat cgtaggttat gattaatact tgggaggtgg gggattatag 60

gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatc ggtgtttgaa tgagggttaaa 120

30 tggagtttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180

cggccaatat agtgatgcca cgtagaaaaa ggtaagttaa aacatacaac gtggctttaa 240

aagatggctt ggctgctaata caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300

35 tcaattctat tgaatgcaaa gcaaagcaaa gcaaagggtt tttgttgttg ttgtcgac 358

<210> 48

40 <211> 361

<212> DNA

45 <213> Tagetes erecta

<220>

50 <221> Antisense Promotor

<222> (1)..(361)

&lt;223&gt;

5 <400> 48  
 ctcgagctta ccgatatgtaa aatcgtagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60  
 taggctttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcgggtgtt gaatgagggtt 120  
 10 aaatggaggtt taattaaaat aaagagaaga gaaagattaa gaggggtgatg gggatattaa 180  
 agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggtaagt gaaaacatac aacgtggctt 240  
 taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca taccctatcc attcaaattc 300  
 15 aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggatc 360  
 c 361

20 <210> 49  
 <211> 28

25 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

30 <220>  
 <221> Primer

35 <222> (1)..(28)  
 <223>

40 <400> 49  
 gagctcactc actgatttcc attgcttg 28

45 <210> 50  
 <211> 37  
 <212> DNA

50 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

5 <222> (1) .. (37)

<223>

10

<400> 50  
cgccggttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

15 <210> 51

<211> 34

<212> DNA

20

<213> kuenstliche Sequenz

25 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (34)

30

<223>

35 <400> 51  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

40 <210> 52

<211> 25

<212> DNA

45 <213> kuenstliche Sequenz

50 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (25)

&lt;223&gt;

5 <400> 52  
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

10 <210> 53

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

15 <213> kuenstliche Sequenz

20 <220>

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1) .. (23)

25 <223>

30 <400> 53  
gaaaataactt catcagcatt acc

23

&lt;210&gt; 54

35 <211> 28

&lt;212&gt; DNA

40 <213> kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

45 <221> Primer

&lt;222&gt; (1) .. (28)

&lt;223&gt;

50

<400> 54  
gtcgactacg taagtttctg cttctacc

28

<210> 55

5 <211> 26

<212> DNA

10 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

15 <221> Primer

<222> (1)..(26)

20 <223>

<400> 55

25 ggatccggtg atacctgcac atcaac

26

<210> 56

30 <211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

35

<220>

40 <221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

45

<400> 56

aagcttgcac gaggcaaagc aaagggtg

28

50

<210> 57

<211> 29



<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

5

<220>

<221> Primer

10

<222> (1)..(29)

<223>

15

<400> 57

gtcgacaacc aaatccagta tacagttac

29

20

<210> 58

<211> 30

25

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

30

<220>

<221> Primer

35

<222> (1)..(30)

<223>

40

<400> 58

aggatccaac caaatccagt atacagttac

30

45

<210> 59

<211> 28

<212> DNA

50

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

5 <222> (1) .. (28)

<223>

10

<400> 59

gaattcgcac gaggcaaagc aaaggttg

28

15 <210> 60

<211> 25

<212> DNA

20

<213> kuenstliche Sequenz

25 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (25)

30

<223>

35 <400> 60

aagcttttggg ttagcactga ttgtc

25

40 <210> 61

<211> 29

<212> DNA

45 <213> kuenstliche Sequenz

50 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (29)

<223>

5 <400> 61  
gtcgacagaa aatacttcat cagcattac

29'

10 <210> 62

<211> 29

<212> DNA

15 <213> kuenstliche Sequenz

20 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

25 <223>

30 <400> 62  
ggatccagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 63

35 <211> 27

<212> DNA

40 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

45 <221> Primer

<222> (1)..(27)

50 <223>

<400> 63  
gaattctctt tggattagca ctgattg

27

<210> 64

5 <211> 23

<212> DNA

10 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

15 <221> Primer

<222> (1) .. (23)

20 <223>

<400> 64  
cgcccttgat ctgtttggat tgg

23

25

<210> 65

<211> 24

30

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

35

<220>

<221> Primer

40

<222> (1) .. (24)

<223>

45

<400> 65  
ctaacaatca atgagtatga gagc

24

50

<210> 66

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

5

<220>

<221> Primer

10

<222> (1)..(26)

<223>

15

<400> 66  
agagcaaggc cagcaggacc acaacc

26

20

<210> 67

<211> 26

25

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

30

<220>

<221> Primer

35

<222> (1)..(26)

<223>

40

<400> 67  
ccttgggagc ttttgggata ggctag

26

45

<210> 68

<211> 26

<212> DNA

50

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

5 <222> (1)..(26)

<223>

10

<400> 68  
tcacgccttg tatctgtttg gattgg

26

15 <210> 69

<211> 15

<212> DNA

20

<213> kuenstliche Sequenz

25 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(15)

30

<223>

35 <400> 69  
gtcgagtatg gagtt

15

40 <210> 70

<211> 28

<212> DNA

45 <213> kuenstliche Sequenz

50 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

&lt;223&gt;

5 <400> 70  
aagcttaccg atagtaaaat cgttagtt

28

10 <210> 71

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

15 <213> kuenstliche Sequenz

20 <220>

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(31)

25 <223>

30 <400> 71  
ctcgagctta ccgatagtaa aatcgttagt t

31

&lt;210&gt; 72

35 <211> 28

&lt;212&gt; DNA

40 <213> kuenstliche Sequenz

45 <400> 72  
gtcgacaaca acaacaaaca acctttgc

28

&lt;210&gt; 73

50 <211> 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

<220>

5 <221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

10

<400> 73  
ggatccaaca acaacaaaca acctttgc

28

15

<210> 74

<211> 28

20

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

25

<220>

<221> Primer

30

<222> (1)..(28)

<223>

35

<400> 74  
gtcgactttt tgttgaagag atttggtg

28

40

<210> 75

<211> 28

45 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

50

<220>

<221> Primer



<222> (1) .. (28)

<223>

5

<400> 75  
ctcgagactc actgatttcc attgcttg

28

10

<210> 76

<211> 22

15 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

20

<220>

<221> Primer

25 <222> (1) .. (22)

<223>

30

<400> 76  
gagctctaca aattagggtt ac

22

35 <210> 77

<211> 23

<212> DNA

40

<213> kuenstliche Sequenz

45 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (23)

50

<223>

<400> 77  
aagcttatta tttccaaatt ccg

23

5 <210> 78

<211> 50

<212> DNA

10 <213> kuenstliche Sequenz

15 <220>

<221> Primer

20 <222> (1)..(50)

<223>

25 <400> 78  
aagctttgca attcatacag aagtgagaaa aatgcagcta gcagcgacag

50

<210> 79

30 <211> 1062

<212> DNA

35 <213> Haematococcus pluvialis

<220>

40 <221> CDS

<222> (32)..(1021)

45 <223>

<400> 79  
aagctttgca attcatacag aagtgagaaa a atg cag cta gca gcg aca gta  
Met Gln Leu Ala Ala Thr Val  
1 5

52

atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag gag aag gag

100

	Met	Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Gly	Ser	Ala	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	
	10						15						20				
5	aag	gag	gtt	gca	ggc	agc	tct	gac	gtg	ttg	cgt	aca	tgg	gcg	acc	cag	148
	Lys	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Ser	Asp	Val	Leu	Arg	Thr	Trp	Ala	Thr	Gln	
	25						30						35				
10	tac	tcg	ctt	ccg	tca	gag	gag	tca	gac	gcg	gcc	cgc	ccg	gga	ctg	aag	196
	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu	Glu	Ser	Asp	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	
	40						45					50				55	
15	aat	gcc	tac	aag	cca	cca	cct	tcc	gac	aca	aag	ggc	atc	aca	atg	gcg	244
	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Pro	Pro	Ser	Asp	Thr	Lys	Gly	Ile	Thr	Met	Ala	
					60						65					70	
	cta	gct	gtc	atc	ggc	tcc	tgg	gcc	gca	gtg	ttc	ctc	cac	gcc	att	ttt	292
	Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Trp	Ala	Ala	Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe	
					75					80					85		
20	caa	atc	aag	ctt	ccg	acc	tcc	ttg	gac	cag	ctg	cac	tgg	ctg	ccc	gtg	340
	Gln	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu	Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	
					90					95					100		
25	tca	gat	gcc	aca	gct	cag	ctg	gtt	agc	ggc	agc	agc	agc	ctg	ctg	cac	388
	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	
		105						110						115			
30	atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	gtc	ctg	gag	ttc	ctg	tac	aca	ggc	ctt	ttt	436
	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu	Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	
	120					125					130					135	
35	atc	acc	acg	cat	gat	gct	atg	cat	ggc	acc	atc	gcc	atg	aga	aac	agg	484
	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	
					140						145					150	
	cag	ctt	aat	gac	ttc	ttg	ggc	aga	gta	tgc	atc	tcc	ttg	tac	gcc	tgg	532
	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	
					155					160					165		
40	ttt	gat	tac	aac	atg	ctg	cac	cgc	aag	cat	tgg	gag	cac	cac	aac	cac	580
	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg	Lys	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	
		170						175						180			
45	act	ggc	gag	gtg	ggc	aag	gac	cct	gac	ttc	cac	agg	gga	aac	cct	ggc	628
	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	
		185						190						195			
50	att	gtg	ccc	tgg	ttt	gcc	agc	ttc	atg	tcc	agc	tac	atg	tcg	atg	tgg	676
	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	Ser	Phe	Met	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp	
	200					205					210					215	
	cag	ttt	gcg	cgc	ctc	gca	tgg	tgg	acg	gtg	gtc	atg	cag	ctg	ctg	ggc	724
	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	Trp	Trp	Thr	Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly	
					220						225					230	

gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg 772  
 Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu  
 235 240 245  
 5  
 tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc cac aag cct 820  
 Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro  
 250 255 260  
 10  
 gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg 868  
 Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp  
 265 270 275  
 15  
 aag tcg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc 916  
 Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys  
 280 285 290 295  
 20  
 tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc 964  
 Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro  
 300 305 310  
 25  
 tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt 1012  
 Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val  
 315 320 325  
 cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcca gctgggcatg c 1062  
 Pro Ala  
 30  
 <210> 80  
 <211> 329  
 35  
 <212> PRT  
 <213> Haematococcus pluvialis  
 40  
 <400> 80  
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15  
 45  
 Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30  
 50  
 Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45

	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Pro	Pro	Ser	Asp	
	50						55					60					
5	Thr	Lys	Gly	Ile	Thr	Met	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Trp	Ala	Ala	
	65					70					75					80	
10	Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe	Gln	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu	Asp	
				85						90					95		
15	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	Ser	
				100					105					110			
20	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu	Glu	
				115				120					125				
25	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	
	130						135					140					
30	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	Val	
	145					150					155					160	
35	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg	Lys	
				165						170					175		
40	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	Asp	
				180					185					190			
45	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	Ser	Phe	Met	
				195				200					205				
50	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	Trp	Trp	Thr	
				210			215					220					
55	Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Phe	
	225					230					235					240	
60	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	
					245					250					255		
65	Thr	Tyr	Met	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	
				260						265				270			

5 Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
     275                    280                    285

10 Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
     290                    295                    300

15 His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
     305                    310                    315                    320

20 Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
     325

25 <210> 81  
     <211> 789  
     <212> DNA  
     <213> Nostoc punctiforme

30 <220>  
     <221> CDS  
     <222> (1)..(789)  
     <223>

40 <400> 81  
     ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa 48  
     Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
     1                    5                    10                    15

45 tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta 96  
     Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
     20                    25                    30

50 att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat 144  
     Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
     35                    40                    45

tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa 192  
     Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
     50                    55                    60

	atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat	240
	Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His	
	65 70 75 80	
5	ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca	288
	Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser	
	85 90 95	
10	cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag	336
	Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys	
	100 105 110	
15	aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat	384
	Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp	
	115 120 125	
20	ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc	432
	Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe	
	130 135 140	
25	atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta	480
	Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu	
	145 150 155 160	
	ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc	528
	Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile	
	165 170 175	
30	tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat	576
	Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr	
	180 185 190	
35	ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat	624
	Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr	
	195 200 205	
40	ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc	672
	Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile	
	210 215 220	
45	gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat	720
	Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His	
	225 230 235 240	
	gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac	768
	Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn	
	245 250 255	
50	aat tca gta acc aat tcg taa	789
	Asn Ser Val Thr Asn Ser	
	260	

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 262

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Nostoc punctiforme

10

&lt;400&gt; 82

Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15

15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30

20

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35 40 45

25

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50 55 60

30

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

35

Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
 85 90 95

40

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
 100 105 110

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
 115 120 125

45

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
 130 135 140

50

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
 145 150 155 160

Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
 165 170 175



5 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

10 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
 195 200 205

15 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
 210 215 220

20 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

25 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
 245 250 255

30 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260

35 <210> 83  
 <211> 762  
 <212> DNA  
 <213> Nostoc punctiforme

40 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(762)  
 <223>

45 <400> 83  
 gtg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca 48  
 Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 50 1 5 10 15  
 gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc 96  
 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30

	att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac	144
	Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp	
	35 40 45	
5	atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa	192
	Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln	
	50 55 60	
10	aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat	240
	Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His	
	65 70 75 80	
15	ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca	288
	Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr	
	85 90 95	
20	ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa	336
	Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys	
	100 105 110	
25	aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat	384
	Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp	
	115 120 125	
30	ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt	432
	Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe	
	130 135 140	
35	atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att	480
	Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile	
	145 150 155 160	
40	tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act	528
	Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr	
	165 170 175	
45	tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat	576
	Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr	
	180 185 190	
50	ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag	624
	Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln	
	195 200 205	
55	cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc	672
	Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile	
	210 215 220	
60	acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat	720
	Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His	
	225 230 235 240	
65	att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag	762

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250

5 <210> 84

<211> 253

<212> PRT

10

<213> Nostoc punctiforme

15 <400> 84

Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15

20

Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30

25 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45

30 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60

35 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
 85 90 95

40

Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110

45 Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp  
 115 120 125

50 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
 130 135 140

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
 145 150 155 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
 165 170 175  
 5

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

10 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205

15 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220

20 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250

25

<210> 85

<211> 804

30 <212> DNA

<213> Synechococcus WH8102

35

<220>

<221> CDS

40 <222> (1) .. (804)

<223>

45

<400> 85

atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac 48  
 Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His  
 1 5 10 15

50 cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc 96  
 Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala  
 20 25 30

	ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc	144
	Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu	
	35 40 45	
5	tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg	192
	Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu	
	50 55 60	
10	ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg	240
	Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu	
	65 70 75 80	
15	ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat	288
	Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His	
	85 90 95	
20	ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca	336
	Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala	
	100 105 110	
25	ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg	384
	Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu	
	115 120 125	
30	gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac	432
	Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn	
	130 135 140	
35	aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg	480
	Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met	
	145 150 155 160	
40	cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc	528
	Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu	
	165 170 175	
45	aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc	576
	Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser	
	180 185 190	
50	gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc	624
	Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr	
	195 200 205	
55	tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg	672
	Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr	
	210 215 220	
60	cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac	720
	Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn	
	225 230 235 240	
	ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt	768

95

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
 245 250 255

cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga

804

5 Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265

<210> 86

10

<211> 267

<212> PRT

15 <213> Synechococcus WH8102

<400> 86

20

Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His  
 1 5 10 15

25 Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala  
 20 25 30

30 Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu  
 35 40 45

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
 50 55 60

35

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu  
 65 70 75 80

40

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
 85 90 95

45 Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110

50 Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu  
 115 120 125

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
 130 135 140

5 Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met  
145 150 155 160

10 Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu  
165 170 175

15 Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser  
180 185 190

20 Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr  
195 200 205

25 Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr  
210 215 220

30 Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn  
225 230 235 240

35 Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
245 250 255

40 Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
260 265

45 <210> 87

<211> 33

<212> DNA

50 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1) .. (33)

<223>

&lt;400&gt; 87

33

gcatgctcta gaccttataa agatattttg tga

5 &lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

10

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

15 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(33)

20

&lt;223&gt;

25 &lt;400&gt; 88

33

gcatgcatct agaaatgggt cagtgtcaac cat

&lt;210&gt; 89

30

&lt;211&gt; 805

&lt;212&gt; DNA

35 &lt;213&gt; Nostoc sp. Strain PCC7120

&lt;220&gt;

40

&lt;221&gt; variation

&lt;222&gt; (1)..(805)

45 &lt;223&gt;

&lt;400&gt; 89

50

gcatgcatct agaaatgggt cagtgtcaac catcatctct gcattcagaa aaactgggtgt 60

tattgtcatc gacaatcaga gatgataaaa atattaataa gggatatattt attgcctgct 120

ttatcttatt tttatgggca attagtttaa tcttattact ctcaatagat acatccataa 180



ttcataagag cttattaggt atagccatgc tttggcagac cttcttatat acaggtttat 240  
5 ttattactgc tcatgatgcc atgcacggcg tagtttatcc caaaaatccc agaataaata 300  
attttatagg taagctcact ctaatcttgt atggactact cccttataaa gatttattga 360  
aaaaacattg gttacaccac ggacatcctg gtactgattt agaccctgat tattacaatg 420  
10 gtcatcccca aaacttcttt ctttggatc tacattttat gaagtcttat tggcgatgga 480  
cgcaaatttt cggattagtg atgatttttc atggacttaa aaatctggtg catataccag 540  
15 aaaataattt aattatattt tggatgatac cttctatttt aagttcagta caactatttt 600  
attttggtag atttttgcct cataaaaagc tagaagggtg ttatactaac cccattgtg 660  
cgcgagtagt cccattacct cttttttggt cttttgttac ttgttatcac ttcggctacc 720  
20 acaaggaaca tcacgaatac cctcaacttc cttggtggaa attacctgaa gtcacaaaaa 780  
tatctttata aggtctagag catgc 805

25 <210> 90

<211> 35

<212> DNA

30

<213> Künstliche Sequenz

35 <220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(35)

40

<223>

45 <400> 90  
gagctcttca ttatttcgat tttgatttcg tgacc

35

<210> 91

50

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

5 <220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(44)

10

<223>

15 <400> 91  
aagcttgagc tcggttgatc agaagaagaa gaagaagatg aact

44

20 <210> 92

<211> 653

<212> DNA

25 <213> Arabidopsis thaliana

30 <220>

<221> promoter

<222> (1)..(653)

35 <223>

40 <400> 92  
gagctcttca ttatttcgat tttgatttcg tgaccagcga acgcagaata ccttgttgtg 60  
taatacttta cccgtgtaaa tcaaaaacaa aaaggctttt gagctttttg tagttgaatt 120  
tctctggctg atcttttctg tacagattca tatactctgca gagacgatat cattgattat 180  
45 ttgagcttct tttgaactat ttcgtgtaat ttgggatgag agctctatgt atgtgtgtaa 240  
actttgaaga caacaagaaa ggtaacaagt gagggaggga tgactccatg tcaaaataga 300  
50 tgtcataaga ggcccatcaa taagtgcttg agcccatag ctagccagat aactaccaga 360  
ttgtgagatg gatgtgtgaa cagttttttt tttgatgtag gactgaaatg tgaacaacag 420  
ggcgcagaaa ggctaaatta ggacaatgat aagcagaaat aacttatcct ctctaact 480

tggcctcaca ttgccttca cacaatccac acacatccaa tcacaacctc atcatatatc 540  
tcccgcataat ctttttttct ttgatctttt tttttttgct tattattttt ttgactttga 600  
5 tctcccatca gttcatcttc ttcttcttct tctgatcaac cgagctcaag ctt 653

10 <210> 93  
<211> 28  
<212> DNA  
15 <213> Künstliche Sequenz

20 <220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(28)  
25 <223>

30 <400> 93 28  
gagctcactc actgatttcc attgcttg

35 <210> 94  
<211> 30  
<212> DNA  
40 <213> Künstliche Sequenz

45 <220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(30)  
50 <223>

<400> 94  
aagcttgagc tctttgttga agagatttgg 30

<210> 95

5 <211> 37

<212> DNA

10 <213> Künstliche Sequenz

<220>

15 <221> primer\_bind

<222> (1)..(37)

<223>

20

<400> 95  
cgccggttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

25

<210> 96

<211> 34

30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

35

<220>

<221> primer\_bind

40

<222> (1)..(34)

<223>

45

<400> 96  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

50

<210> 97

<211> 831

<213> Haematococcus pluvialis

**<220>**

10

$\langle 22\bar{3} \rangle$

<400> 97

```
<400> 97
atg cca tcc gag tcg tca gac gca gct cgt cct gtg ttg aag cac gcc      48
Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Val Leu Lys His Ala
1          5          10          15
```

tat aaa cct cca gca tct gac gcc aag ggc atc act atg gcg ctg acc 96  
Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr  
20 25 30

atc att ggc acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttc caa atc 144  
Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
35 40 45

30' agg cta ccg aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa 192  
Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
50 55 60

35 gcc aca gcc cag ctg ttg ggc gga agc agc agc cta ttg cac atc gcc 240  
Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
65 70 75 80

gca gtc ttc att gta ctt gag ttt ctg tac act ggt cta ttc atc acc 288  
Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr  
40 85 90 95

acg cat gat gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg aac agg cag ctc 336  
Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg Asn Arg Gln Leu  
100 105 110

aat gat ctc ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac  
Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp

115                  120                  125

50    tac agc atg cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg aaa                      432  
Tyr Ser Met His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys  
               130                          135                          140

gac cct gac ttc cac aaa gga aat cct ggc ctt gtc ccc tgg ttc gcc 480

## 103

Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe Ala  
 145 150 155 160

5 agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg gca 528  
 Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala  
 165 170 175

10 tgg tgg gca gtg gtg atg caa acg ttg ggg gcc ccc atg gcg aat ctc 576  
 Trp Trp Ala Val Val Met Gln Thr Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu  
 180 185 190

cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc ttc 624  
 Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe  
 195 200 205

15 tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca gca 672  
 Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala Ala  
 210 215 220

20 ggc tct cag gtc atg tct tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca tct 720  
 Gly Ser Gln Val Met Ser Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala Ser  
 225 230 235 240

25 gat gtg atg agc ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg ttt gcc ccc 768  
 Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu Phe Ala Pro  
 245 250 255

30 tgg tgg cag ctg ccc cac tgc cgc cgc ctg tct ggg cgt ggc ctg gtg 816  
 Trp Trp Gln Leu Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val  
 260 265 270

cct gcc ttg gca tga 831  
 Pro Ala Leu Ala  
 275

35

<210> 98

<211> 276

40 <212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

45

<400> 98

50 Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Val Leu Lys His Ala  
 1 5 10 15

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr  
 20 25 30

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
35 40 45

5

Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
50 55 60

10

Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
65 70 75 80

15

Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr  
85 90 95

20

Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg Asn Arg Gln Leu  
100 105 110

25

Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp  
115 120 125

30

Tyr Ser Met His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys  
130 135 140

35

Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe Ala  
145 150 155 160

40

Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala  
165 170 175

45

Trp Trp Ala Val Val Met Gln Thr Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu  
180 185 190

50

Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe  
195 200 205

55

Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala Ala  
210 215 220

60

Gly Ser Gln Val Met Ser Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala Ser  
225 230 235 240

Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu Phe Ala Pro  
 245 250 255

5 Trp Trp Gln Leu Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val  
 260 265 270

10 Pro Ala Leu Ala  
 275

<210> 99

15 <211> 729

<212> DNA

20 <213> Paracoccus sp. MBIC1143

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(729)

30 <223>

<400> 99

35 atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg 48  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15

40 atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96  
 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30

45 gcg ctg tgg ttt ctg gac gca gcg gcg cat ccc atc ctg gcg atc gca 144  
 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala  
 35 40 45

aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg 192  
 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60

50 cat gac gcg atg cac ggg tcg gtg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat 240  
 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80

gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg 288



## 106

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

	cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc	336
5	Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr	
	100 105 110	
	gac gac gac ccc gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc	384
10	Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala	
	115 120 125	
	cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc	432
15	Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro	
	130 135 140	
	gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctt ggg gat cgc tgg atg tac	480
20	Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr	
	145 150 155 160	
	gtg gtc ttc tgg ccg ctg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc	528
25	Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe	
	165 170 175	
	gtg ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg	576
30	Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro	
	180 185 190	
	gac cgc cac aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac ccc gtg tcg ctg	624
35	Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu	
	195 200 205	
	ctg acc tgc ttt cac ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac	672
40	Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His	
	210 215 220	
	ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac	720
45	Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp	
	225 230 235 240	
50	acc gca tga	729
	Thr Ala	
	<210> 100	
	<211> 242	
	<212> PRT	
	<213> Paracoccus sp. MBIC1143	

&lt;400&gt; 100

5 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15  
 10 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30  
 15 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala  
 35 40 45  
 20 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60  
 25 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80  
 30 Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95  
 35 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110  
 40 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
 115 120 125  
 45 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140  
 50 Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160  
 Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
 165 170 175  
 Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
 180 185 190  
 55 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
 195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

5 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240

Thr Ala

10

<210> 101

15 <211> 735

<212> DNA

20 <213> Brevundimonas aurantiaca

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(735)

<223>

30

<400> 101

35 atg acc gcc gcc gtc gcc gag cca cgc acc gtc ccg cgc cag acc tgg 48  
 Met Thr Ala Ala Val Ala Glu Pro Arg Thr Val Pro Arg Gln Thr Trp  
 1 5 10 15

40 atc ggt ctg acc ctg gcg gga atg atc gtg gcg gga tgg gcg gtt ctg 96  
 Ile Gly Leu Thr Leu Ala Gly Met Ile Val Ala Gly Trp Ala Val Leu  
 20 25 30

45 cat gtc tac gcc gtc tat ttt cac cga tgg ggg ccg ttg acc ctg gtg 144  
 His Val Tyr Gly Val Tyr Phe His Arg Trp Gly Pro Leu Thr Leu Val  
 35 40 45

atc gcc ccg gcg atc gtg gcg gtc cag acc tgg ttg tcg gtc gcc ctt 192  
 Ile Ala Pro Ala Ile Val Ala Val Gln Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu  
 50 55 60

50 ttc atc gtc gcc cat gac gcc atg tac gcc tcc ctg gcg ccg gga cgg 240  
 Phe Ile Val Ala His Asp Ala Met Tyr Gly Ser Leu Ala Pro Gly Arg  
 65 70 75 80

ccg cgg ctg aac gcc gca gtc gcc cgg ctg acc ctg ggg ctc tat gcg 288

## 109

Pro Arg Leu Asn Ala Ala Val Gly Arg Leu Thr Leu Gly Leu Tyr Ala  
85 90 95

5      ggc ttc cgc ttc gat cgg ctg aag acg gcg cac cac gcc cac cac gcc      336  
Gly Phe Arg Phe Asp Arg Leu Lys Thr Ala His His Ala His His Ala  
                100                         105                         110

gcg ccc ggc acg gcc gac gac ccg gat ttt cac gcc ccg gcg ccc cgc      384  
Ala Pro Gly Thr Ala Asp Asp Pro Asp Phe His Ala Pro Ala Pro Arg

10                  115                        120                        125

gcc ttc ctt ccc tgg ttc ctg aac ttc ttt cgc acc tat ttc ggc tgg 432  
Ala Phe Leu Pro Trp Phe Leu Asn Phe Phe Arg Thr Tyr Phe Gly Trp  
130 135 140

cgc gag atg gcg gtc ctg acc gcc ctg gtc ctg atc gcc ctc ttc ggc 480  
 Arg Glu Met Ala Val Leu Thr Ala Leu Val Leu Ile Ala Leu Phe Gly  
 145 150 155 160

**20**     ctg ggg gcg cgg ccg gcc aat ctc ctg acc ttc tgg gcc gcg ccg gcc                528  
Leu Gly Ala Arg Pro Ala Asn Leu Leu Thr Phe Trp Ala Ala Pro Ala  
                        165                      170                      175

	ctg	ctt	tca	gcg	ctt	cag	ctc	ttc	acc	ttc	ggc	acc	tgg	ctg	cgc	cac	576
25	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Thr	Phe	Gly	Thr	Trp	Leu	Pro	His	
				180					185					190			

**30**

cgc	cac	acc	gac	cag	ccg	ttc	gcc	gac	gcg	cac	cac	gcc	cgc	agc	agc	624
Arg	His	Thr	Asp	Gln	Pro	Phe	Ala	Asp	Ala	His	His	Ala	Arg	Ser	Ser	
		195					200					205				

ggc tac ggc ccc gtg ctt tcc ctg ctc acc tgt ttc cac ttc ggc cgc 672  
 Gly Tyr Gly Pro Val Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Arg  
 210 215 220

cac	cac	gaa	cac	cat	ctg	agc	ccc	tgg	cgg	ccc	tgg	tgg	cgt	ctg	tgg	720
His	His	Glu	His	His	Leu	Ser	Pro	Trp	Arg	Pro	Trp	Trp	Arg	Leu	Trp	
225					230					235					240	

40      cgc ggc gag tct tga      735  
         Arg Gly Glu Ser

45      <210>      102

<211> 244

<212> PRT

50 <213> Brevundimonas aurantiaca

&lt;400&gt; 102

Met Thr Ala Ala Val Ala Glu Pro Arg Thr Val Pro Arg Gln Thr Trp  
 1 5 10 15

5

Ile Gly Leu Thr Leu Ala Gly Met Ile Val Ala Gly Trp Ala Val Leu  
 20 25 30

10

His Val Tyr Gly Val Tyr Phe His Arg Trp Gly Pro Leu Thr Leu Val  
 35 40 45

15

Ile Ala Pro Ala Ile Val Ala Val Gln Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu  
 50 55 60

20

Phe Ile Val Ala His Asp Ala Met Tyr Gly Ser Leu Ala Pro Gly Arg  
 65 70 75 80

25

Pro Arg Leu Asn Ala Ala Val Gly Arg Leu Thr Leu Gly Leu Tyr Ala  
 85 90 95

Gly Phe Arg Phe Asp Arg Leu Lys Thr Ala His His Ala His His Ala  
 100 105 110

30

Ala Pro Gly Thr Ala Asp Asp Pro Asp Phe His Ala Pro Ala Pro Arg  
 115 120 125

35

Ala Phe Leu Pro Trp Phe Leu Asn Phe Phe Arg Thr Tyr Phe Gly Trp  
 130 135 140

40

Arg Glu Met Ala Val Leu Thr Ala Leu Val Leu Ile Ala Leu Phe Gly  
 145 150 155 160

45

Leu Gly Ala Arg Pro Ala Asn Leu Leu Thr Phe Trp Ala Ala Pro Ala  
 165 170 175

Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr Phe Gly Thr Trp Leu Pro His  
 180 185 190

50

Arg His Thr Asp Gln Pro Phe Ala Asp Ala His His Ala Arg Ser Ser  
 195 200 205

111

Gly Tyr Gly Pro Val Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Arg  
 210 215 220

5 His His Glu His His Leu Ser Pro Trp Arg Pro Trp Trp Arg Leu Trp  
 225 230 235 240

10 Arg Gly Glu Ser

<210> 103

15 <211> 690

<212> DNA

20 <213> Nodularia spumigena NSOR10

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(690)

30 <223>

<400> 103 48  
 atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc agc cta ggt ttg tta  
 35 Met Ala Ile Ala Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

40 ctt tat att gat ata tcc caa ttc aag ttt tgg atg ttg tta ccg ctc 96  
 Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu  
 20 25 30

45 ata ttt tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca gct cat 144  
 Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 35 40 45

gat gcc atg cat ggg gta gtt ttt ccc aaa aat ccc aaa atc aac cat 192  
 Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His  
 50 55 60

50 ttc att ggc tca ttg tgc ctg ttt ctt tat ggt ctt tta cct tat caa 240  
 Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln  
 65 70 75 80

aaa ctt tta aaa aag cat tgg cta cat cac cat aat cca gcc agt gaa 288

## 112

Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Glu  
 85 90 95

5 aca gat cca gat ttt cac aac ggg aag cag aaa aac ttt ttt gct tgg 336  
 Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn Phe Phe Ala Trp  
 100 105 110

10 tat tta tat ttt atg aag cgt tac tgg agt tgg tta caa att atc aca 384  
 Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu Gln Ile Ile Thr  
 115 120 125

15 tta atg att att tat aac tta cta aaa tat ata tgg cat ttt cca gag 432  
 Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp His Phe Pro Glu  
 130 135 140

gat aat atg act tat ttt tgg gta gtt ccc tca att tta agt tct tta 480  
 Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile Leu Ser Ser Leu  
 145 150 155 160

20 caa tta ttt tat ttt gga act ttt cta ccc cac agt gag cct gta gaa 528  
 Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Val Glu  
 165 170 175

25 ggt tat aaa gag cct cat cgt tcc caa act att agc cgt ccc att tgg 576  
 Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp  
 180 185 190

30 tgg tca ttt ata act tgt tac cat ttt ggt tat cat tac gaa cat cat 624  
 Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Tyr Glu His His  
 195 200 205

35 gaa tac ccc cat gtt cct tgg tgg caa tta cca gaa att tat aaa atg 672  
 Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Met  
 210 215 220

tct aaa tca aat ttg tga 690  
 Ser Lys Ser Asn Leu  
 225

40 <210> 104  
 <211> 229

45 <212> PRT  
 <213> Nodularia spumigena NSOR10

50 <400> 104  
 Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

5 Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu  
 20 25 30

10 Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 35 40 45

15 Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His  
 50 55 60

20 Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln  
 65 70 75 80

25 Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Glu  
 85 90 95

30 Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn Phe Phe Ala Trp  
 100 105 110

35 Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu Gln Ile Ile Thr  
 115 120 125

40 Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp His Phe Pro Glu  
 130 135 140

45 Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile Leu Ser Ser Leu  
 145 150 155 160

50 Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Val Glu  
 165 170 175

55 Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp  
 180 185 190

60 Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Tyr Glu His His  
 195 200 205

65 Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Met  
 210 215 220



Ser Lys Ser Asn Leu  
225

5 <210> 105

<211> 1536

<212> DNA

10

<213> Deinococcus radiodurans R1

15 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1536)

20

<223>

25 <400> 105

atg ccg gat tac gac ctg atc gtc atg ggc gcg ggc cac aac gcg ctg 48  
Met Pro Asp Tyr Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Gly His Asn Ala Leu  
1 5 10 15

30 gtg act gct gcc tac gcc gcc cgg gcg ggc ctg aaa gtc ggc gtg ttc 96  
Val Thr Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Ala Gly Leu Lys Val Gly Val Phe  
20 25 30

35 gag cgg cgg cac ctc gtc ggc ggg gcg gtc agc acc gag gag gtc gtg 144  
Glu Arg Arg His Leu Val Gly Gly Ala Val Ser Thr Glu Glu Val Val  
35 40 45

40 ccc ggt tac cgc ttc gac tac ggc ggc agc gcc cac atc ctg att cgg 192  
Pro Gly Tyr Arg Phe Asp Tyr Gly Gly Ser Ala His Ile Leu Ile Arg  
50 55 60

atg acg ccc atc gtg cgc gaa ctc gaa ctc acg cgg cac ggg ctg cat 240  
Met Thr Pro Ile Val Arg Glu Leu Glu Leu Thr Arg His Gly Leu His  
65 70 75 80

45 tac ctc gaa gtg gac cct atg ttt cac gct tcc gac ggt gaa acg ccc 288  
Tyr Leu Glu Val Asp Pro Met Phe His Ala Ser Asp Gly Glu Thr Pro  
85 90 95

50 tgg ttc att cac cgc gac gcc ggg cgg acc atc cgc gaa ctg gac gaa 336  
Trp Phe Ile His Arg Asp Ala Gly Arg Thr Ile Arg Glu Leu Asp Glu  
100 105 110

aag ttt ccc ggg cag ggc gac gcc tac ggg cgc ttt ctc gac gat tgg 384

## 115

	Lys	Phe	Pro	Gly	Gln	Gly	Asp	Ala	Tyr	Gly	Arg	Phe	Leu	Asp	Asp	Trp	
			115					120					125				
5	aca	ccc	ttc	gcg	cgc	gcc	gtg	gcc	gac	ctg	ttc	aac	tcg	gcg	ccg	ggg	432
	Thr	Pro	Phe	Ala	Arg	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Phe	Asn	Ser	Ala	Pro	Gly	
			130				135					140					
10	ccg	ctc	gac	ctg	ggc	aaa	atg	gtg	atg	cgc	agc	ggc	cag	ggc	aag	gac	480
	Pro	Leu	Asp	Leu	Gly	Lys	Met	Val	Met	Arg	Ser	Gly	Gln	Gly	Lys	Asp	
			145				150				155					160	
15	tgg	aac	gag	cag	ctc	ccg	cgc	atc	ctg	cgg	ccc	tac	ggc	gac	gtg	gcg	528
	Trp	Asn	Glu	Gln	Leu	Pro	Arg	Ile	Leu	Arg	Pro	Tyr	Gly	Asp	Val	Ala	
					165				170						175		
	cgc	gag	tac	ttc	agc	gag	gag	cgc	gtg	cgg	gct	ccc	ctg	acc	tgg	atg	576
	Arg	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	Glu	Arg	Val	Arg	Ala	Pro	Leu	Thr	Trp	Met	
				180					185						190		
20	gcg	gcc	cag	agc	ggc	ccc	cca	ccc	tcg	gac	ccg	ctg	agc	gcg	ccc	ttt	624
	Ala	Ala	Gln	Ser	Gly	Pro	Pro	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Ala	Pro	Phe	
			195					200					205				
25	ttg	ctg	tgg	cac	ccg	ctc	tac	cac	gaa	ggc	ggc	gtg	gcg	cgg	ccc	aaa	672
	Leu	Leu	Trp	His	Pro	Leu	Tyr	His	Glu	Gly	Gly	Val	Ala	Arg	Pro	Lys	
		210					215					220					
30	ggc	ggc	agc	ggc	ggc	ctg	acc	aaa	gcc	ctg	cgc	cgg	gcc	acc	gag	gcc	720
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Leu	Thr	Lys	Ala	Leu	Arg	Arg	Ala	Thr	Glu	Ala	
		225				230					235				240		
35	gaa	ggc	ggc	gag	gtc	ttc	acc	gac	gcg	ccg	gtc	aag	gaa	att	ctg	gtc	768
	Glu	Gly	Gly	Glu	Val	Phe	Thr	Asp	Ala	Pro	Val	Lys	Glu	Ile	Leu	Val	
				245					250						255		
	aag	gac	ggc	aag	gcg	cag	ggc	atc	cgg	ctg	gaa	agc	ggc	gag	acg	tac	816
	Lys	Asp	Gly	Lys	Ala	Gln	Gly	Ile	Arg	Leu	Glu	Ser	Gly	Glu	Thr	Tyr	
			260					265						270			
40	acc	gcc	cgc	gcc	gtc	gtg	tcg	ggc	gtc	cac	atc	ctg	acc	act	gcg	aat	864
	Thr	Ala	Arg	Ala	Val	Val	Ser	Gly	Val	His	Ile	Leu	Thr	Thr	Ala	Asn	
			275					280					285				
45	gcc	ctg	ccc	gcc	gaa	tat	gtc	cct	agc	gcc	gcc	agg	aat	gtg	cgc	gtg	912
	Ala	Leu	Pro	Ala	Glu	Tyr	Val	Pro	Ser	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Arg	Val	
		290					295					300					
50	ggc	aac	ggc	ttc	ggc	atg	att	ttg	cgc	ctc	gcc	ctc	agt	gaa	aaa	gtc	960
	Gly	Asn	Gly	Phe	Gly	Met	Ile	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	
		305				310					315				320		
	aaa	tac	cgt	cac	cac	acc	gag	ccc	gac	tca	cgc	atc	ggc	ctg	gga	ttg	1008
	Lys	Tyr	Arg	His	His	Thr	Glu	Pro	Asp	Ser	Arg	Ile	Gly	Leu	Gly	Leu	
					325					330					335		

	ctg atc aaa aac gag cgg caa atc atg cag ggc tac ggc gaa tac ctc Leu Ile Lys Asn Glu Arg Gln Ile Met Gln Gly Tyr Gly Glu Tyr Leu 340 345 350	1056
5	gcc ggg cag ccc acc acc gac ccg ccc ctc gtc gcc atg agc ttc agc Ala Gly Gln Pro Thr Thr Asp Pro Pro Leu Val Ala Met Ser Phe Ser 355 360 365	1104
10	gcg gtg gac gac tcg ctc gcc cca ccg aac ggc gac gtg ttg tgg ctg Ala Val Asp Asp Ser Leu Ala Pro Pro Asn Gly Asp Val Leu Trp Leu 370 375 380	1152
15	tgg gcg cag tac tac ccc ttc gag ctc gcc acc ggg agc tgg gaa acg Trp Ala Gln Tyr Tyr Pro Phe Glu Leu Ala Thr Gly Ser Trp Glu Thr 385 390 395 400	1200
20	cgc acc gcc gaa gcg cgg gag aac atc ctg cgg gcc ttt gag cac tac Arg Thr Ala Glu Ala Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Phe Glu His Tyr 405 410 415	1248
	gcg ccg ggc acc cgc gac acg att gtg ggc gaa ctc gtg cag acg ccg Ala Pro Gly Thr Arg Asp Thr Ile Val Gly Glu Leu Val Gln Thr Pro 420 425 430	1296
25	cag tgg ctg gaa acc aac ctc ggc ctg cac cgg ggc aac gtg atg cac Gln Trp Leu Glu Thr Asn Leu Gly Leu His Arg Gly Asn Val Met His 435 440 445	1344
30	ctg gaa atg tcc ttc gac cag atg ttc tcc ttc cgc ccc tgg ctg aaa Leu Glu Met Ser Phe Asp Gln Met Phe Ser Phe Arg Pro Trp Leu Lys 450 455 460	1392
35	gcg agc cag tac cgc tgg ccg ggc gtg cag ggg ctg tac ctc acc ggc Ala Ser Gln Tyr Arg Trp Pro Gly Val Gln Gly Leu Tyr Leu Thr Gly 465 470 475 480	1440
40	gcc agc acc cac ccc ggc gga ggc atc atg ggc gcc tcg gga cgc aac Ala Ser Thr His Pro Gly Gly Gly Ile Met Gly Ala Ser Gly Arg Asn 485 490 495	1488
45	gcg gcg cgg gtc atc gtg aag gac ctg acg cgg agg cgc tgg aaa tga Ala Ala Arg Val Ile Val Lys Asp Leu Thr Arg Arg Arg Trp Lys 500 505 510	1536
	<210> 106	
	<211> 511	
50	<212> PRT	
	<213> Deinococcus radiodurans R1	

&lt;400&gt; 106

5 Met Pro Asp Tyr Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Gly His Asn Ala Leu  
 1 5 10 15

10 Val Thr Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Ala Gly Leu Lys Val Gly Val Phe  
 20 25 30

15 Glu Arg Arg His Leu Val Gly Gly Ala Val Ser Thr Glu Glu Val Val  
 35 40 45

20 Pro Gly Tyr Arg Phe Asp Tyr Gly Gly Ser Ala His Ile Leu Ile Arg  
 50 55 60

25 Met Thr Pro Ile Val Arg Glu Leu Glu Leu Thr Arg His Gly Leu His  
 65 70 75 80

30 Tyr Leu Glu Val Asp Pro Met Phe His Ala Ser Asp Gly Glu Thr Pro  
 85 90 95

35 Trp Phe Ile His Arg Asp Ala Gly Arg Thr Ile Arg Glu Leu Asp Glu  
 100 105 110

40 Lys Phe Pro Gly Gln Gly Asp Ala Tyr Gly Arg Phe Leu Asp Asp Trp  
 115 120 125

45 Thr Pro Phe Ala Arg Ala Val Ala Asp Leu Phe Asn Ser Ala Pro Gly  
 130 135 140

50 Pro Leu Asp Leu Gly Lys Met Val Met Arg Ser Gly Gln Gly Lys Asp  
 145 150 155 160

55 Trp Asn Glu Gln Leu Pro Arg Ile Leu Arg Pro Tyr Gly Asp Val Ala  
 165 170 175

60 Arg Glu Tyr Phe Ser Glu Glu Arg Val Arg Ala Pro Leu Thr Trp Met  
 180 185 190

65 Ala Ala Gln Ser Gly Pro Pro Pro Ser Asp Pro Leu Ser Ala Pro Phe  
 195 200 205

5 Leu Leu Trp His Pro Leu Tyr His Glu Gly Gly Val Ala Arg Pro Lys  
 210 215 220  
 Gly Gly Ser Gly Gly Leu Thr Lys Ala Leu Arg Arg Ala Thr Glu Ala  
 225 230 235 240  
 10 Glu Gly Gly Glu Val Phe Thr Asp Ala Pro Val Lys Glu Ile Leu Val  
 245 250 255  
 15 Lys Asp Gly Lys Ala Gln Gly Ile Arg Leu Glu Ser Gly Glu Thr Tyr  
 260 265 270  
 20 Thr Ala Arg Ala Val Val Ser Gly Val His Ile Leu Thr Thr Ala Asn  
 275 280 285  
 Ala Leu Pro Ala Glu Tyr Val Pro Ser Ala Ala Arg Asn Val Arg Val  
 290 295 300  
 25 Gly Asn Gly Phe Gly Met Ile Leu Arg Leu Ala Leu Ser Glu Lys Val  
 305 310 315 320  
 30 Lys Tyr Arg His His Thr Glu Pro Asp Ser Arg Ile Gly Leu Gly Leu  
 325 330 335  
 35 Leu Ile Lys Asn Glu Arg Gln Ile Met Gln Gly Tyr Gly Glu Tyr Leu  
 340 345 350  
 40 Ala Gly Gln Pro Thr Thr Asp Pro Pro Leu Val Ala Met Ser Phe Ser  
 355 360 365  
 Ala Val Asp Asp Ser Leu Ala Pro Pro Asn Gly Asp Val Leu Trp Leu  
 370 375 380  
 45 Trp Ala Gln Tyr Tyr Pro Phe Glu Leu Ala Thr Gly Ser Trp Glu Thr  
 385 390 395 400  
 50 Arg Thr Ala Glu Ala Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Phe Glu His Tyr  
 405 410 415

119

Ala Pro Gly Thr Arg Asp Thr Ile Val Gly Glu Leu Val Gln Thr Pro  
 420 425 430

5 Gln Trp Leu Glu Thr Asn Leu Gly Leu His Arg Gly Asn Val Met His  
 435 440 445

10 Leu Glu Met Ser Phe Asp Gln Met Phe Ser Phe Arg Pro Trp Leu Lys  
 450 455 460

15 Ala Ser Gln Tyr Arg Trp Pro Gly Val Gln Gly Leu Tyr Leu Thr Gly  
 465 470 475 480

Ala Ser Thr His Pro Gly Gly Gly Ile Met Gly Ala Ser Gly Arg Asn  
 485 490 495

20 Ala Ala Arg Val Ile Val Lys Asp Leu Thr Arg Arg Arg Trp Lys  
 500 505 510

25 <210> 107

<211> 1666

<212> DNA

30 <213> Lycopersicon esculentum

35 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1494)

40 <223>

45 <400> 107 48  
 atg gaa gct ctt ctc aag cct ttt cca tct ctt tta ctt tcc tct cct  
 Met Glu Ala Leu Leu Lys Pro Phe Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ser Pro  
 1 5 10 15

50 aca ccc cat agg tct att ttc caa caa aat ccc tct ttt cta agt ccc 96  
 Thr Pro His Arg Ser Ile Phe Gln Gln Asn Pro Ser Phe Leu Ser Pro  
 20 25 30

acc acc aaa aaa aaa tca aga aaa tgt ctt ctt aga aac aaa agt agt 144

## 120

	Thr	Thr	Lys	Lys	Lys	Ser	Arg	Lys	Cys	Leu	Leu	Arg	Asn	Lys	Ser	Ser	
	35					40					45						
5	aaa	ctt	ttt	tgt	agc	ttt	ctt	gat	tta	gca	ccc	aca	tca	aag	cca	gag	192
	Lys	Leu	Phe	Cys	Ser	Phe	Leu	Asp	Leu	Ala	Pro	Thr	Ser	Lys	Pro	Glu	
	50					55					60						
10	tct	tta	gat	gtt	aac	atc	tca	tgg	gtt	gat	cct	aat	tcg	aat	cgg	gct	240
	Ser	Leu	Asp	Val	Asn	Ile	Ser	Trp	Val	Asp	Pro	Asn	Ser	Asn	Arg	Ala	
	65					70					75					80	
15	caa	ttc	gac	gtg	atc	att	atc	gga	gct	ggc	cct	gct	ggg	ctc	agg	cta	288
	Gln	Phe	Asp	Val	Ile	Ile	Ile	Gly	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Arg	Leu	
	85					90					95						
20	gct	gaa	caa	gtt	tct	aaa	tat	ggg	att	aag	gta	tgt	tgt	gtt	gac	cct	336
	Ala	Glu	Gln	Val	Ser	Lys	Tyr	Gly	Ile	Lys	Val	Cys	Cys	Val	Asp	Pro	
	100					105					110						
25	tca	cca	ctc	tcc	atg	tgg	cca	aat	aat	tat	ggg	gtt	tgg	gtt	gat	gag	384
	Ser	Pro	Leu	Ser	Met	Trp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Val	Asp	Glu	
	115					120					125						
30	ttt	gag	aat	tta	gga	ctg	gaa	aat	tgt	tta	gat	cat	aaa	tgg	cct	atg	432
	Phe	Glu	Asn	Leu	Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Leu	Asp	His	Lys	Trp	Pro	Met	
	130					135					140						
35	act	tgt	gtg	cat	ata	aat	gat	aac	aaa	act	aag	tat	ttg	gga	aga	cca	480
	Thr	Cys	Val	His	Ile	Asn	Asp	Asn	Lys	Thr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Arg	Pro	
	145					150					155					160	
40	tat	ggg	aga	gtt	agt	aga	aag	aag	ctg	aag	ttg	aaa	ttg	ttg	aat	agt	528
	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	Lys	Lys	Leu	Lys	Leu	Lys	Leu	Leu	Asn	Ser	
	165					170					175						
45	tgt	gtt	gag	aac	aga	gtg	aag	ttt	tat	aaa	gct	aag	gtt	tgg	aaa	gtg	576
	Cys	Val	Glu	Asn	Arg	Val	Lys	Phe	Tyr	Lys	Ala	Lys	Val	Trp	Lys	Val	
	180					185					190						
50	gaa	cat	gaa	gaa	ttt	gag	tct	tca	att	gtt	tgt	gat	gat	ggg	aag	aag	624
	Glu	His	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Ser	Ile	Val	Cys	Asp	Asp	Gly	Lys	Lys	
	195					200					205						
55	ata	aga	ggg	agt	ttg	gtt	gtg	gat	gca	agt	ggg	ttt	gct	agt	gat	ttt	672
	Ile	Arg	Gly	Ser	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Ser	Asp	Phe	
	210					215					220						
60	ata	gag	tat	gac	agg	cca	aga	aac	cat	ggg	tat	caa	att	gct	cat	ggg	720
	Ile	Glu	Tyr	Asp	Arg	Pro	Arg	Asn	His	Gly	Tyr	Gln	Ile	Ala	His	Gly	
	225					230					235					240	
65	gtt	tta	gta	gaa	gtt	gat	aat	cat	cca	ttt	gat	ttg	gat	aaa	atg	gtg	768
	Val	Leu	Val	Glu	Val	Asp	Asn	His	Pro	Phe	Asp	Leu	Asp	Lys	Met	Val	
	245					250					255						

	ctt atg gat tgg agg gat tct cat ttg ggt aat gag cca tat tta agg Leu Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Gly Asn Glu Pro Tyr Leu Arg 260 265 270	816
5	gtg aat aat gct aaa gaa cca aca ttc ttg tat gca atg cca ttt gat Val Asn Asn Ala Lys Glu Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Asp 275 280 285	864
10	aga gat ttg gtt ttc ttg gaa gag act tct ttg gtg agt cgt cct gtt Arg Asp Leu Val Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ser Arg Pro Val 290 295 300	912
15	tta tcg tat atg gaa gta aaa aga agg atg gtg gca aga tta agg cat Leu Ser Tyr Met Glu Val Lys Arg Arg Met Val Ala Arg Leu Arg His 305 310 315 320	960
20	ttg ggg atc aaa gtg aaa agt gtt att gag gaa gag aaa tgt gtg atc Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Val Ile Glu Glu Glu Lys Cys Val Ile 325 330 335	1008
	cct atg gga gga cca ctt ccg cgg att cct caa aat gtt atg gct att Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Arg Ile Pro Gln Asn Val Met Ala Ile 340 345 350	1056
25	ggg ggg aat tca ggg ata gtt cat cca tca aca ggg tac atg gtg gct Gly Gly Asn Ser Gly Ile Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala 355 360 365	1104
30	agg agc atg gct tta gca cca gta cta gct gaa gcc atc gtc gag ggg Arg Ser Met Ala Leu Ala Pro Val Leu Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly 370 375 380	1152
35	ctt ggc tca aca aga atg ata aga ggg tct caa ctt tac cat aga gtt Leu Gly Ser Thr Arg Met Ile Arg Gly Ser Gln Leu Tyr His Arg Val 385 390 395 400	1200
40	tgg aat ggt ttg tgg cct ttg gat aga aga tgt gtt aga gaa tgt tat Trp Asn Gly Leu Trp Pro Leu Asp Arg Arg Cys Val Arg Glu Cys Tyr 405 410 415	1248
	tca ttt ggg atg gag aca ttg ttg aag ctt gat ttg aaa ggg act agg Ser Phe Gly Met Glu Thr Leu Leu Lys Leu Asp Leu Lys Gly Thr Arg 420 425 430	1296
45	aga ttg ttt gac gct ttc ttt gat ctt gat cct aaa tac tgg caa ggg Arg Leu Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Asp Pro Lys Tyr Trp Gln Gly 435 440 445	1344
50	ttc ctt tct tca aga ttg tct gtc aaa gaa ctt ggt tta ctc agc ttg Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Val Lys Glu Leu Gly Leu Leu Ser Leu 450 455 460	1392
	tgt ctt ttc gga cat ggc tca aac atg act agg ttg gat att gtt aca	1440



122

Cys Leu Phe Gly His Gly Ser Asn Met Thr Arg Leu Asp Ile Val Thr  
 465 470 475 480

5 aaa tgt cct ctt cct ttg gtt aga ctg att ggc aat cta gca ata gag 1488  
 Lys Cys Pro Leu Pro Leu Val Arg Leu Ile Gly Asn Leu Ala Ile Glu  
 485 490 495

10 agc ctt tgaatgtgaa aagtttgaat cattttcttc attttaattt ctttgattat 1544  
 Ser Leu

15 tttcatattt tctcaattgc aaaagtgaga taagagctac atactgtcaa caaataaact 1604  
 actattggaa agttaaataa tgtgtttgtt gtatgttatt ctaatggaat ggattttgta 1664  
 aa 1666

20 <210> 108

<211> 498

<212> PRT

25 <213> Lycopersicon esculentum

30 <400> 108

Met Glu Ala Leu Leu Lys Pro Phe Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ser Pro  
 1 5 10 15

35 Thr Pro His Arg Ser Ile Phe Gln Gln Asn Pro Ser Phe Leu Ser Pro  
 20 25 30

40 Thr Thr Lys Lys Lys Ser Arg Lys Cys Leu Leu Arg Asn Lys Ser Ser  
 35 40 45

45 Lys Leu Phe Cys Ser Phe Leu Asp Leu Ala Pro Thr Ser Lys Pro Glu  
 50 55 60

Ser Leu Asp Val Asn Ile Ser Trp Val Asp Pro Asn Ser Asn Arg Ala  
 65 70 75 80

50 Gln Phe Asp Val Ile Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Leu Arg Leu  
 85 90 95

## 123

	Ala	Glu	Gln	Val	Ser	Lys	Tyr	Gly	Ile	Lys	Val	Cys	Cys	Val	Asp	Pro	
				100					105						110		
5	Ser	Pro	Leu	Ser	Met	Trp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Val	Asp	Glu	
			115					120					125				
10	Phe	Glu	Asn	Leu	Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Leu	Asp	His	Lys	Trp	Pro	Met	
		130					135					140					
15	Thr	Cys	Val	His	Ile	Asn	Asp	Asn	Lys	Thr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Arg	Pro	
	145					150					155					160	
20	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	Lys	Lys	Leu	Lys	Leu	Lys	Leu	Leu	Asn	Ser	
					165				170						175		
25	Cys	Val	Glu	Asn	Arg	Val	Lys	Phe	Tyr	Lys	Ala	Lys	Val	Trp	Lys	Val	
				180				185						190			
30	Glu	His	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Ser	Ile	Val	Cys	Asp	Asp	Gly	Lys	Lys	
			195					200					205				
35	Ile	Arg	Gly	Ser	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Ser	Asp	Phe	
		210					215					220					
40	Ile	Glu	Tyr	Asp	Arg	Pro	Arg	Asn	His	Gly	Tyr	Gln	Ile	Ala	His	Gly	
	225					230					235					240	
45	Val	Leu	Val	Glu	Val	Asp	Asn	His	Pro	Phe	Asp	Leu	Asp	Lys	Met	Val	
					245					250					255		
50	Leu	Met	Asp	Trp	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Gly	Asn	Glu	Pro	Tyr	Leu	Arg	
				260					265					270			
55	Val	Asn	Asn	Ala	Lys	Glu	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ala	Met	Pro	Phe	Asp	
				275				280					285				
60	Arg	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	Glu	Glu	Thr	Ser	Leu	Val	Ser	Arg	Pro	Val	
	290						295					300					
65	Leu	Ser	Tyr	Met	Glu	Val	Lys	Arg	Arg	Met	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	His	
	305					310				315						320	

5 Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Val Ile Glu Glu Glu Lys Cys Val Ile  
                             325                            330                            335

10 Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Arg Ile Pro Gln Asn Val Met Ala Ile  
                             340                            345                            350

15 Gly Gly Asn Ser Gly Ile Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala  
                             355                            360                            365

20 Arg Ser Met Ala Leu Ala Pro Val Leu Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly  
                             370                            375                            380

25 Leu Gly Ser Thr Arg Met Ile Arg Gly Ser Gln Leu Tyr His Arg Val  
                             385                            390                            395                            400

30 Trp Asn Gly Leu Trp Pro Leu Asp Arg Arg Cys Val Arg Glu Cys Tyr  
                             405                            410                            415

35 Ser Phe Gly Met Glu Thr Leu Leu Lys Leu Asp Leu Lys Gly Thr Arg  
                             420                            425                            430

40 Arg Leu Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Asp Pro Lys Tyr Trp Gln Gly  
                             435                            440                            445

45 Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Val Lys Glu Leu Gly Leu Leu Ser Leu  
                             450                            455                            460

50 Cys Leu Phe Gly His Gly Ser Asn Met Thr Arg Leu Asp Ile Val Thr  
                             465                            470                            475                            480

Lys Cys Pro Leu Pro Leu Val Arg Leu Ile Gly Asn Leu Ala Ile Glu  
                             485                            490                            495

Ser Leu

<210> 109

<211> 1125

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

10

&lt;222&gt; (20)..(946)

&lt;223&gt;

15

&lt;400&gt; 109

ttgggtcatct ccacaatca atg gct gcc gcc gcc aga atc tcc gcc tcc tct 52

20

Met Ala Ala Ala Ala Arg Ile Ser Ala Ser Ser

1 5 10

acc tca cga act ttt tat ttc cgt cat tca ccg ttt ctt ggc cca aaa 100

Thr Ser Arg Thr Phe Tyr Phe Arg His Ser Pro Phe Leu Gly Pro Lys

15 20 25

25

cct act tcg aca acc tca cat gtt tct cca atc tct cct ttt tct ctt 148

Pro Thr Ser Thr Thr Ser His Val Ser Pro Ile Ser Pro Phe Ser Leu

30 35 40

30

aat cta ggc cca att ttg agg tct aga aga aaa ccc agt ttc act gtt 196

Asn Leu Gly Pro Ile Leu Arg Ser Arg Arg Lys Pro Ser Phe Thr Val

45 50 55

35

tgc ttt gtt ctc gag gat gag aag ctg aaa cct caa ttt gac gat gag 244

Cys Phe Val Leu Glu Asp Glu Lys Leu Lys Pro Gln Phe Asp Asp Glu

60 65 70 75

40

gct gag gat ttt gaa aag aag att gag gaa cag atc tta gct act cgc 292

Ala Glu Asp Phe Glu Lys Lys Ile Glu Glu Gln Ile Leu Ala Thr Arg

80 85 90

ttg gcg gag aaa ctg gct agg aag aaa tcg gag agg ttt act tat ctt 340

Leu Ala Glu Lys Leu Ala Arg Lys Lys Ser Glu Arg Phe Thr Tyr Leu

95 100 105

45

gtg gct gct ata atg tct agt ttt ggg att act tct atg gct gtt atg 388

Val Ala Ala Ile Met Ser Ser Phe Gly Ile Thr Ser Met Ala Val Met

110 115 120

50

gct gtt tat tac aga ttt tcg tgg caa atg gag gga gga gaa gtt cct 436

Ala Val Tyr Tyr Arg Phe Ser Trp Gln Met Glu Gly Gly Glu Val Pro

125 130 135

gta acc gaa atg ttg ggt aca ttt gct ctc tct gtt ggt gct gct gta 484

## 126

	Val Thr Glu Met Leu Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala Ala Val	
	140 145 150 155	
5	gga atg gag ttt tgg gcg aga tgg gca cac aaa gca ctg tgg cat gct Gly Met Glu Phe Trp Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp His Ala	532
	160 165 170	
10	tca cta tgg cac atg cat gag tca cac cac aaa cca aga gaa gga cct Ser Leu Trp His Met His Glu Ser His His Lys Pro Arg Glu Gly Pro	580
	175 180 185	
15	ttt gag ctg aac gac gtt ttc gcc ata aca aac gct gtt cca gca ata Phe Glu Leu Asn Asp Val Phe Ala Ile Thr Asn Ala Val Pro Ala Ile	628
	190 195 200	
20	gcc ctc ctc aac tat ggt ttc ttc cat aaa ggc ctc att gcc gga cta Ala Leu Leu Asn Tyr Gly Phe Phe His Lys Gly Leu Ile Ala Gly Leu	676
	205 210 215	
25	tgc ttc ggt gct ggg cta ggg atc aca gta ttt gga atg gca tac atg Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly Ile Thr Val Phe Gly Met Ala Tyr Met	724
	220 225 230 235	
30	ttt gtt cac gat ggt ttg gtt cac aag aga ttc cca gtt gga cct gta Phe Val His Asp Gly Leu Val His Lys Arg Phe Pro Val Gly Pro Val	772
	240 245 250	
35	gcc aat gta cct tat ctt agg aag gtg gct gct gct cat tcg ctt cat Ala Asn Val Pro Tyr Leu Arg Lys Val Ala Ala Ala His Ser Leu His	820
	255 260 265	
40	cac tca gag aag ttc aat ggt gtc cca tat ggc ttg ttc ttc gga cct His Ser Glu Lys Phe Asn Gly Val Pro Tyr Gly Leu Phe Phe Gly Pro	868
	270 275 280	
45	aag gaa ctg gaa gaa gta gga ggg acg gaa gag ttg gaa aag gaa gtg Lys Glu Leu Glu Glu Val Gly Gly Thr Glu Glu Leu Glu Lys Glu Val	916
	285 290 295	
50	ata cga agg acg aga ctt tcg aaa gga tca tgaacgattg ttcataaaca Ile Arg Arg Thr Arg Leu Ser Lys Gly Ser	966
	300 305	
55	tagaatgtca ttttacactt cttatcaatg aggaagggtg atttttgatg tatttgatag	1026
60	tagagaaaaa tgtagctctc ttgatgaaat gaatttgat ttagtaggc tcttcttatt	1086
65	cagtaagatt ttttcttttt tttgatctcg tgccgaatt	1125
70	<210> 110	
75	<211> 309	

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

5

&lt;400&gt; 110

10 Met Ala Ala Ala Ala Arg Ile Ser Ala Ser Ser Thr Ser Arg Thr Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Phe Arg His Ser Pro Phe Leu Gly Pro Lys Pro Thr Ser Thr Thr  
 20 25 30  
 15 Ser His Val Ser Pro Ile Ser Pro Phe Ser Leu Asn Leu Gly Pro Ile  
 35 40 45  
 20 Leu Arg Ser Arg Arg Lys Pro Ser Phe Thr Val Cys Phe Val Leu Glu  
 50 55 60  
 25 Asp Glu Lys Leu Lys Pro Gln Phe Asp Asp Glu Ala Glu Asp Phe Glu  
 65 70 75 80  
 30 Lys Lys Ile Glu Glu Gln Ile Leu Ala Thr Arg Leu Ala Glu Lys Leu  
 85 90 95  
 35 Ala Arg Lys Lys Ser Glu Arg Phe Thr Tyr Leu Val Ala Ala Ile Met  
 100 105 110  
 Ser Ser Phe Gly Ile Thr Ser Met Ala Val Met Ala Val Tyr Tyr Arg  
 115 120 125  
 40 Phe Ser Trp Gln Met Glu Gly Gly Glu Val Pro Val Thr Glu Met Leu  
 130 135 140  
 45 Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Gly Met Glu Phe Trp  
 145 150 155 160  
 50 Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp His Ala Ser Leu Trp His Met  
 165 170 175  
 His Glu Ser His His Lys Pro Arg Glu Gly Pro Phe Glu Leu Asn Asp  
 180 185 190

Val Phe Ala Ile Thr Asn Ala Val Pro Ala Ile Ala Leu Leu Asn Tyr  
 195 200 205  
 5

Gly Phe Phe His Lys Gly Leu Ile Ala Gly Leu Cys Phe Gly Ala Gly  
 210 215 220  
 10

Leu Gly Ile Thr Val Phe Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly  
 225 230 235 240  
 15

Leu Val His Lys Arg Phe Pro Val Gly Pro Val Ala Asn Val Pro Tyr  
 245 250 255  
 20

Leu Arg Lys Val Ala Ala Ala His Ser Leu His His Ser Glu Lys Phe  
 260 265 270  
 25

Asn Gly Val Pro Tyr Gly Leu Phe Phe Gly Pro Lys Glu Leu Glu Glu  
 275 280 285  
 30

Val Gly Gly Thr Glu Glu Leu Glu Lys Glu Val Ile Arg Arg Thr Arg  
 290 295 300  
 35

Leu Ser Lys Gly Ser  
 305  
 40

<210> 111  
 <211> 1779  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 45

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (1779)  
 50  
 <223>

<400> 111  
 atg gat ctc cgt cgg agg cct cct aaa cca ccg gtt acc aac aac aac 48  
 Met Asp Leu Arg Arg Arg Pro Pro Lys Pro Pro Val Thr Asn Asn Asn  
 1 5 10 15  
 5 aac tcc aac gga tct ttc cgt tct tat cag cct cgc act tcc gat gac 96  
 Asn Ser Asn Gly Ser Phe Arg Ser Tyr Gln Pro Arg Thr Ser Asp Asp  
 20 25 30  
 10 gat cat cgt cgc cgg gct aca aca att gct cct cca ccg aaa gca tcc 144  
 Asp His Arg Arg Arg Ala Thr Thr Ile Ala Pro Pro Pro Lys Ala Ser  
 35 40 45  
 15 gac gcg ctt cct ctt ccg tta tat ctc aca aac gcc gtt ttc ttc acg 192  
 Asp Ala Leu Pro Leu Pro Leu Tyr Leu Thr Asn Ala Val Phe Phe Thr  
 50 55 60  
 20 ctc ttc ttc tcc gtc gcg tat tac ctc ctc cac cgg tgg cgt gac aag 240  
 Leu Phe Phe Ser Val Ala Tyr Tyr Leu Leu His Arg Trp Arg Asp Lys  
 65 70 75 80  
 atc cgt tac aat acg cct ctt cac gtc gtc act atc aca gaa ctc ggc 288  
 Ile Arg Tyr Asn Thr Pro Leu His Val Val Thr Ile Thr Glu Leu Gly  
 85 90 95  
 25 gcc att att gct ctc atc gct tcg ttt atc tat ctc cta ggg ttt ttt 336  
 Ala Ile Ile Ala Leu Ile Ala Ser Phe Ile Tyr Leu Leu Gly Phe Phe  
 100 105 110  
 30 ggt att gac ttt gtt cag tca ttt atc tca cgt gcc tct ggt gat gct 384  
 Gly Ile Asp Phe Val Gln Ser Phe Ile Ser Arg Ala Ser Gly Asp Ala  
 115 120 125  
 35 tgg gat ctc gcc gat acg atc gat gat gat gac cac cgc ctt gtc acg 432  
 Trp Asp Leu Ala Asp Thr Ile Asp Asp Asp Asp His Arg Leu Val Thr  
 130 135 140  
 40 tgc tct cca ccg act ccg atc gtt tcc gtt gct aaa tta cct aat ccg 480  
 Cys Ser Pro Pro Thr Pro Ile Val Ser Val Ala Lys Leu Pro Asn Pro  
 145 150 155 160  
 gaa cct att gtt acc gaa tcg ctt cct gag gaa gac gag gag att gtg 528  
 Glu Pro Ile Val Thr Glu Ser Leu Pro Glu Glu Asp Glu Glu Ile Val  
 165 170 175  
 45 aaa tcg gtt atc gac gga gtt att cca tcg tac tcg ctt gaa tct cgt 576  
 Lys Ser Val Ile Asp Gly Val Ile Pro Ser Tyr Ser Leu Glu Ser Arg  
 180 185 190  
 50 ctc ggt gat tgc aaa aga gcg gcg tcg att cgt cgt gag gcg ttg cag 624  
 Leu Gly Asp Cys Lys Arg Ala Ala Ser Ile Arg Arg Glu Ala Leu Gln  
 195 200 205  
 aga gtc acc ggg aga tcg att gaa ggg tta ccg ttg gat gga ttt gat 672



## 130

	Arg Val Thr Gly Arg Ser Ile Glu Gly Leu Pro Leu Asp Gly Phe Asp	
	210 215 220	
5	tat gaa tcg att ttg ggg caa tgc tgt gag atg cct gtt gga tac att Tyr Glu Ser Ile Leu Gly Gln Cys Cys Glu Met Pro Val Gly Tyr Ile	720
	225 230 235 240	
10	cag att cct gtt ggg att gct ggt cca ttg ttg ctt gat ggt tat gag Gln Ile Pro Val Gly Ile Ala Gly Pro Leu Leu Leu Asp Gly Tyr Glu	768
	245 250 255	
15	tac tct gtt cct atg gct aca acc gaa ggt tgt ttg gtt gct agc act Tyr Ser Val Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser Thr	816
	260 265 270	
20	aac aga ggc tgc aag gct atg ttt atc tct ggt ggc gcc acc agt acc Asn Arg Gly Cys Lys Ala Met Phe Ile Ser Gly Gly Ala Thr Ser Thr	864
	275 280 285	
25	gtt ctt aag gac ggt atg acc cga gca cct gtt gtt cgg ttc gct tcg Val Leu Lys Asp Gly Met Thr Arg Ala Pro Val Val Arg Phe Ala Ser	912
	290 295 300	
30	gcg aga cga gct tcg gag ctt aag ttt ttc ttg gag aat cca gag aac Ala Arg Arg Ala Ser Glu Leu Lys Phe Phe Leu Glu Asn Pro Glu Asn	960
	305 310 315 320	
35	ttt gat act ttg gca gta gtc ttc aac agg tcg agt aga ttt gca aga Phe Asp Thr Leu Ala Val Val Phe Asn Arg Ser Ser Arg Phe Ala Arg	1008
	325 330 335	
40	ctg caa agt gtt aaa tgc aca atc gcg ggg aag aat gct tat gta agg Leu Gln Ser Val Lys Cys Thr Ile Ala Gly Lys Asn Ala Tyr Val Arg	1056
	340 345 350	
45	ttc tgt tgt agt act ggt gat gct atg ggg atg aat atg gtt tct aaa Phe Cys Cys Ser Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Val Ser Lys	1104
	355 360 365	
50	ggg gtg cag aat gtt ctt gag tat ctt acc gat gat ttc cct gac atg Gly Val Gln Asn Val Leu Glu Tyr Leu Thr Asp Asp Phe Pro Asp Met	1152
	370 375 380	
55	gat gtg att gga atc tct ggt aac ttc tgt tcg gac aag aaa cct gct Asp Val Ile Gly Ile Ser Gly Asn Phe Cys Ser Asp Lys Lys Pro Ala	1200
	385 390 395 400	
60	gct gtg aac tgg att gag gga cgt ggt aaa tca gtt gtt tgc gag gct Ala Val Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Cys Glu Ala	1248
	405 410 415	
65	gta atc aga gga gag atc gtg aac aag gtc ttg aaa acg agc gtg gct Val Ile Arg Gly Glu Ile Val Asn Lys Val Leu Lys Thr Ser Val Ala	1296
	420 425 430	

5 gct tta gtc gag ctc aac atg ctc aag aac cta gct ggc tct gct gtt 1344  
 Ala Leu Val Glu Leu Asn Met Leu Lys Asn Leu Ala Gly Ser Ala Val  
 435 440 445

10 gca ggc tct cta ggt gga ttc aac gct cat gcc agt aac ata gtg tct 1392  
 Ala Gly Ser Leu Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ser Asn Ile Val Ser  
 450 455 460

15 gct gta ttc ata gct act ggc caa gat cca gct caa aac gtg gag agt 1440  
 Ala Val Phe Ile Ala Thr Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn Val Glu Ser  
 465 470 475 480

20 tct caa tgc atc acc atg atg gaa gct att aat gac ggc aaa gat atc 1488  
 Ser Gln Cys Ile Thr Met Met Glu Ala Ile Asn Asp Gly Lys Asp Ile  
 485 490 495

25 cat atc tca gtc act atg cca tct atc gag gtg ggg aca gtg gga gga 1536  
 His Ile Ser Val Thr Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Val Gly Gly  
 500 505 510

30 gga aca cag ctt gca tct caa tca gcg tgt tta aac ctg ctc gga gtt 1584  
 Gly Thr Gln Leu Ala Ser Gln Ser Ala Cys Leu Asn Leu Leu Gly Val  
 515 520 525

35 aaa gga gca agc aca gag tcg ccg gga atg aac gca agg agg cta gcg 1632  
 Lys Gly Ala Ser Thr Glu Ser Pro Gly Met Asn Ala Arg Arg Leu Ala  
 530 535 540

40 acg atc gta gcc gga gca gtt tta gct gga gag tta tct tta atg tca 1680  
 Thr Ile Val Ala Gly Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Met Ser  
 545 550 555 560

45 gca att gca gct gga cag ctt gtg aga agt cac atg aaa tac aat aga 1728  
 Ala Ile Ala Ala Gly Gln Leu Val Arg Ser His Met Lys Tyr Asn Arg  
 565 570 575

50 tcc agc cga gac atc tct gga gca acg aca acg aca aca aca aca 1776  
 Ser Ser Arg Asp Ile Ser Gly Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
 580 585 590

tga 1779

45 <210> 112  
 <211> 592  
 <212> PRT  
 50 <213> Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 112

Met Asp Leu Arg Arg Arg Pro Pro Lys Pro Pro Val Thr Asn Asn Asn  
 1 5 10 15  
 5

Asn Ser Asn Gly Ser Phe Arg Ser Tyr Gln Pro Arg Thr Ser Asp Asp  
 20 25 30

10 Asp His Arg Arg Arg Ala Thr Thr Ile Ala Pro Pro Pro Lys Ala Ser  
 35 40 45

15 Asp Ala Leu Pro Leu Pro Leu Tyr Leu Thr Asn Ala Val Phe Phe Thr  
 50 55 60

20 Leu Phe Phe Ser Val Ala Tyr Tyr Leu Leu His Arg Trp Arg Asp Lys  
 65 70 75 80

Ile Arg Tyr Asn Thr Pro Leu His Val Val Thr Ile Thr Glu Leu Gly  
 85 90 95  
 25

Ala Ile Ile Ala Leu Ile Ala Ser Phe Ile Tyr Leu Leu Gly Phe Phe  
 100 105 110

30 Gly Ile Asp Phe Val Gln Ser Phe Ile Ser Arg Ala Ser Gly Asp Ala  
 115 120 125

35 Trp Asp Leu Ala Asp Thr Ile Asp Asp Asp Asp His Arg Leu Val Thr  
 130 135 140

40 Cys Ser Pro Pro Thr Pro Ile Val Ser Val Ala Lys Leu Pro Asn Pro  
 145 150 155 160

Glu Pro Ile Val Thr Glu Ser Leu Pro Glu Glu Asp Glu Glu Ile Val  
 165 170 175  
 45

Lys Ser Val Ile Asp Gly Val Ile Pro Ser Tyr Ser Leu Glu Ser Arg  
 180 185 190

50 Leu Gly Asp Cys Lys Arg Ala Ala Ser Ile Arg Arg Glu Ala Leu Gln  
 195 200 205

## 133

Arg Val Thr Gly Arg Ser Ile Glu Gly Leu Pro Leu Asp Gly Phe Asp  
 210 215 220

5 Tyr Glu Ser Ile Leu Gly Gln Cys Cys Glu Met Pro Val Gly Tyr Ile  
 225 230 235 240

10 Gln Ile Pro Val Gly Ile Ala Gly Pro Leu Leu Leu Asp Gly Tyr Glu  
 245 250 255

15 Tyr Ser Val Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser Thr  
 260 265 270

20 Asn Arg Gly Cys Lys Ala Met Phe Ile Ser Gly Gly Ala Thr Ser Thr  
 275 280 285

Val Leu Lys Asp Gly Met Thr Arg Ala Pro Val Val Arg Phe Ala Ser  
 290 295 300

25 Ala Arg Arg Ala Ser Glu Leu Lys Phe Phe Leu Glu Asn Pro Glu Asn  
 305 310 315 320

30 Phe Asp Thr Leu Ala Val Val Phe Asn Arg Ser Ser Arg Phe Ala Arg  
 325 330 335

35 Leu Gln Ser Val Lys Cys Thr Ile Ala Gly Lys Asn Ala Tyr Val Arg  
 340 345 350

Phe Cys Cys Ser Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Val Ser Lys  
 355 360 365

40 Gly Val Gln Asn Val Leu Glu Tyr Leu Thr Asp Asp Phe Pro Asp Met  
 370 375 380

45 Asp Val Ile Gly Ile Ser Gly Asn Phe Cys Ser Asp Lys Lys Pro Ala  
 385 390 395 400

50 Ala Val Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Cys Glu Ala  
 405 410 415

Val Ile Arg Gly Glu Ile Val Asn Lys Val Leu Lys Thr Ser Val Ala  
 420 425 430



&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1401)

5 &lt;223&gt;

&lt;400&gt; 113

10	atg gct gtt gcg ctc caa ttc agc cga tta tgc gtt cga ccg gat act	48
	Met Ala Val Ala Leu Gln Phe Ser Arg Leu Cys Val Arg Pro Asp Thr	
	1                      5                      10                      15	
15	ttc gtg cgg gag aat cat ctc tct gga tcc gga tct ctc cgc cgc cgg	96
	Phe Val Arg Glu Asn His Leu Ser Gly Ser Gly Ser Leu Arg Arg Arg	
	20                      25                      30	
20	aaa gct tta tca gtc cgg tgc tcg tct ggc gat gag aac gct cct tcg	144
	Lys Ala Leu Ser Val Arg Cys Ser Ser Gly Asp Glu Asn Ala Pro Ser	
	35                      40                      45	
25	cca tcg gtg gtg atg gac tcc gat ttc gac gcc aag gtg ttc cgt aag	192
	Pro Ser Val Val Met Asp Ser Asp Phe Asp Ala Lys Val Phe Arg Lys	
	50                      55                      60	
30	aac ttg acg aga agc gat aat tac aat cgt aaa ggg ttc ggt cat aag	240
	Asn Leu Thr Arg Ser Asp Asn Tyr Asn Arg Lys Gly Phe Gly His Lys	
	65                      70                      75                      80	
35	gag gag aca ctc aag ctc atg aat cga gag tac acc agt gat ata ttg	288
	Glu Glu Thr Leu Lys Leu Met Asn Arg Glu Tyr Thr Ser Asp Ile Leu	
	85                      90                      95	
40	gag aca ctg aaa aca aat ggg tat act tat tct tgg gga gat gtt act	336
	Glu Thr Leu Lys Thr Asn Gly Tyr Thr Tyr Ser Trp Gly Asp Val Thr	
	100                      105                      110	
45	gtg aaa ctc gct aaa gca tat ggt ttt tgc tgg ggt gtt gag cgt gct	384
	Val Lys Leu Ala Lys Ala Tyr Gly Phe Cys Trp Gly Val Glu Arg Ala	
	115                      120                      125	
50	gtt cag att gca tat gaa gca cga aag cag ttt cca gag gag agg ctt	432
	Val Gln Ile Ala Tyr Glu Ala Arg Lys Gln Phe Pro Glu Glu Arg Leu	
	130                      135                      140	
55	tgg att act aac gaa atc att cat aac ccg acc gtc aat aag agg ttg	480
	Trp Ile Thr Asn Glu Ile Ile His Asn Pro Thr Val Asn Lys Arg Leu	
	145                      150                      155                      160	
60	gaa gat atg gat gtt aaa att att ccg gtt gag gat tca aag aaa cag	528
	Glu Asp Met Asp Val Lys Ile Ile Pro Val Glu Asp Ser Lys Lys Gln	
	165                      170                      175	
	ttt gat gta gta gag aaa gat gat gtg gtt atc ctt cct gcg ttt gga	576

## 136

	Phe Asp Val Val Glu Lys Asp Asp Val Val Ile Leu Pro Ala Phe Gly	
	180 185 190	
5	gct ggt gtt gac gag atg tat gtt ctt aat gat aaa aag gtg caa att Ala Gly Val Asp Glu Met Tyr Val Leu Asn Asp Lys Lys Val Gln Ile	624
	195 200 205	
10	gtt gac acg act tgt cct tgg gtg aca aag gtc tgg aac acg gtt gag Val Asp Thr Thr Cys Pro Trp Val Thr Lys Val Trp Asn Thr Val Glu	672
	210 215 220	
15	aag cac aag aag ggg gaa tac aca tca gta atc cat ggt aaa tat aat Lys His Lys Lys Gly Glu Tyr Thr Ser Val Ile His Gly Lys Tyr Asn	720
	225 230 235 240	
	cat gaa gag acg att gca act gcg tct ttt gca gga aag tac atc att His Glu Glu Thr Ile Ala Thr Ala Ser Phe Ala Gly Lys Tyr Ile Ile	768
	245 250 255	
20	gta aag aac atg aaa gag gca aat tac gtt tgt gat tac att ctc ggt Val Lys Asn Met Lys Glu Ala Asn Tyr Val Cys Asp Tyr Ile Leu Gly	816
	260 265 270	
25	ggc caa tac gat gga tct agc tcc aca aaa gag gag ttc atg gag aaa Gly Gln Tyr Asp Gly Ser Ser Ser Thr Lys Glu Glu Phe Met Glu Lys	864
	275 280 285	
30	ttc aaa tac gca att tcg aag ggt ttc gat ccc gac aat gac ctt gtc Phe Lys Tyr Ala Ile Ser Lys Gly Phe Asp Pro Asp Asn Asp Leu Val	912
	290 295 300	
35	aaa gtt ggt att gca aac caa aca acg atg cta aag gga gaa aca gag Lys Val Gly Ile Ala Asn Gln Thr Thr Met Leu Lys Gly Glu Thr Glu	960
	305 310 315 320	
	gag ata gga aga tta ctc gag aca aca atg atg cgc aag tat gga gtg Glu Ile Gly Arg Leu Leu Glu Thr Thr Met Met Arg Lys Tyr Gly Val	1008
	325 330 335	
40	gaa aat gta agc gga cat ttc atc agc ttc aac aca ata tgc gac gct Glu Asn Val Ser Gly His Phe Ile Ser Phe Asn Thr Ile Cys Asp Ala	1056
	340 345 350	
45	act caa gag cga caa gac gca atc tat gag cta gtg gaa gag aag att Thr Gln Glu Arg Gln Asp Ala Ile Tyr Glu Leu Val Glu Glu Lys Ile	1104
	355 360 365	
50	gac ctc atg cta gtg gtt ggc gga tgg aat tca agt aac acc tct cac Asp Leu Met Leu Val Val Gly Gly Trp Asn Ser Ser Asn Thr Ser His	1152
	370 375 380	
	ctt cag gaa atc tca gag gca cgg gga atc cca tct tac tgg atc gat Leu Gln Glu Ile Ser Glu Ala Arg Gly Ile Pro Ser Tyr Trp Ile Asp	1200
	385 390 395 400	

agt gag aaa cgg ata gga cct ggg aat aaa ata gcc tat aag ctc cac 1248  
 Ser Glu Lys Arg Ile Gly Pro Gly Asn Lys Ile Ala Tyr Lys Leu His  
 405 410 415  
 5 tat gga gaa ctg gtc gag aag gaa aac ttt ctc cca aag gga cca ata 1296  
 Tyr Gly Glu Leu Val Glu Lys Glu Asn Phe Leu Pro Lys Gly Pro Ile  
 420 425 430  
 10 aca atc ggt gtg aca tca ggt gca tca acc ccg gat aag gtc gtg gaa 1344  
 Thr Ile Gly Val Thr Ser Gly Ala Ser Thr Pro Asp Lys Val Val Glu  
 435 440 445  
 15 gat gct ttg gtg aag gtg ttc gac att aaa cgt gaa gag tta ttg cag 1392  
 Asp Ala Leu Val Lys Val Phe Asp Ile Lys Arg Glu Glu Leu Leu Gln  
 450 455 460  
 ctg gct tga 1401  
 Leu Ala  
 20 465  
 <210> 114  
 25 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana ISPH  
 30  
 <400> 114  
 35 Met Ala Val Ala Leu Gln Phe Ser Arg Leu Cys Val Arg Pro Asp Thr  
 1 5 10 15  
 Phe Val Arg Glu Asn His Leu Ser Gly Ser Gly Ser Leu Arg Arg Arg  
 40 20 25 30  
 Lys Ala Leu Ser Val Arg Cys Ser Ser Gly Asp Glu Asn Ala Pro Ser  
 35 40 45  
 45 Pro Ser Val Val Met Asp Ser Asp Phe Asp Ala Lys Val Phe Arg Lys  
 50 55 60  
 50 Asn Leu Thr Arg Ser Asp Asn Tyr Asn Arg Lys Gly Phe Gly His Lys  
 65 70 75 80



## 138

	Glu	Glu	Thr	Leu	Lys	Leu	Met	Asn	Arg	Glu	Tyr	Thr	Ser	Asp	Ile	Leu	
					85					90					95		
5	Glu	Thr	Leu	Lys	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Ser	Trp	Gly	Asp	Val	Thr	
				100				105					110				
10	Val	Lys	Leu	Ala	Lys	Ala	Tyr	Gly	Phe	Cys	Trp	Gly	Val	Glu	Arg	Ala	
			115					120					125				
15	Val	Gln	Ile	Ala	Tyr	Glu	Ala	Arg	Lys	Gln	Phe	Pro	Glu	Glu	Arg	Leu	
		130					135					140					
20	Trp	Ile	Thr	Asn	Glu	Ile	Ile	His	Asn	Pro	Thr	Val	Asn	Lys	Arg	Leu	
	145					150					155				160		
25	Glu	Asp	Met	Asp	Val	Lys	Ile	Ile	Pro	Val	Glu	Asp	Ser	Lys	Lys	Gln	
					165					170					175		
30	Phe	Asp	Val	Val	Glu	Lys	Asp	Asp	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Ala	Phe	Gly	
			180						185					190			
35	Ala	Gly	Val	Asp	Glu	Met	Tyr	Val	Leu	Asn	Asp	Lys	Lys	Val	Gln	Ile	
			195					200					205				
40	Val	Asp	Thr	Thr	Cys	Pro	Trp	Val	Thr	Lys	Val	Trp	Asn	Thr	Val	Glu	
		210					215					220					
45	Lys	His	Lys	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Ser	Val	Ile	His	Gly	Lys	Tyr	Asn	
	225					230					235				240		
50	His	Glu	Glu	Thr	Ile	Ala	Thr	Ala	Ser	Phe	Ala	Gly	Lys	Tyr	Ile	Ile	
					245					250					255		
55	Val	Lys	Asn	Met	Lys	Glu	Ala	Asn	Tyr	Val	Cys	Asp	Tyr	Ile	Leu	Gly	
				260					265					270			
60	Gly	Gln	Tyr	Asp	Gly	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Glu	Glu	Phe	Met	Glu	Lys	
			275					280					285				
65	Phe	Lys	Tyr	Ala	Ile	Ser	Lys	Gly	Phe	Asp	Pro	Asp	Asn	Asp	Leu	Val	
				290				295					300				

5 Lys Val Gly Ile Ala Asn Gln Thr Thr Met Leu Lys Gly Glu Thr Glu  
 305 310 315 320  
 Glu Ile Gly Arg Leu Leu Glu Thr Thr Met Met Arg Lys Tyr Gly Val  
 325 330 335  
 10 Glu Asn Val Ser Gly His Phe Ile Ser Phe Asn Thr Ile Cys Asp Ala  
 340 345 350  
 15 Thr Gln Glu Arg Gln Asp Ala Ile Tyr Glu Leu Val Glu Glu Lys Ile  
 355 360 365  
 20 Asp Leu Met Leu Val Val Gly Gly Trp Asn Ser Ser Asn Thr Ser His  
 370 375 380  
 Leu Gln Glu Ile Ser Glu Ala Arg Gly Ile Pro Ser Tyr Trp Ile Asp  
 385 390 395 400  
 25 Ser Glu Lys Arg Ile Gly Pro Gly Asn Lys Ile Ala Tyr Lys Leu His  
 405 410 415  
 30 Tyr Gly Glu Leu Val Glu Lys Glu Asn Phe Leu Pro Lys Gly Pro Ile  
 420 425 430  
 35 Thr Ile Gly Val Thr Ser Gly Ala Ser Thr Pro Asp Lys Val Val Glu  
 435 440 445  
 40 Asp Ala Leu Val Lys Val Phe Asp Ile Lys Arg Glu Glu Leu Leu Gln  
 450 455 460  
 Leu Ala  
 465  
 45 <210> 115  
 <211> 2160  
 50 <212> DNA  
 <213> Lycopersicon esculentum

&lt;220&gt;

5 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(2160)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 115

15	atg gct ttg tgt gct tat gca ttt cct ggg att ttg aac agg act ggt	48
	Met Ala Leu Cys Ala Tyr Ala Phe Pro Gly Ile Leu Asn Arg Thr Gly	
	1                      5                      10                      15	
20	gtg gtt tca gat tct tct aag gca acc cct ttg ttc tct gga tgg att	96
	Val Val Ser Asp Ser Ser Lys Ala Thr Pro Leu Phe Ser Gly Trp Ile	
	20                      25                      30	
25	cat gga aca gat ctg cag ttt ttg ttc caa cac aag ctt act cat gag	144
	His Gly Thr Asp Leu Gln Phe Leu Phe Gln His Lys Leu Thr His Glu	
	35                      40                      45	
30	gtc aag aaa agg tca cgt gtg gtt cag gct tcc tta tca gaa tct gga	192
	Val Lys Lys Arg Ser Arg Val Val Gln Ala Ser Leu Ser Glu Ser Gly	
	50                      55                      60	
35	gaa tac tac aca cag aga ccg cca acg cct att ttg gac act gtg aac	240
	Glu Tyr Tyr Thr Gln Arg Pro Pro Thr Pro Ile Leu Asp Thr Val Asn	
	65                      70                      75                      80	
40	tat ccc att cat atg aaa aat ctg tct ctg aag gaa ctt aaa caa cta	288
	Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Leu Lys Glu Leu Lys Gln Leu	
	85                      90                      95	
45	gca gat gaa cta agg tca gat aca att ttc aat gta tca aag act ggg	336
	Ala Asp Glu Leu Arg Ser Asp Thr Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr Gly	
	100                      105                      110	
50	ggg cac ctt ggc tca agt ctt ggt gtt gtt gag ctg act gtt gct ctt	384
	Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu	
	115                      120                      125	
55	cat tat gtc ttc aat gca ccg caa gat agg att ctc tgg gat gtt ggt	432
	His Tyr Val Phe Asn Ala Pro Gln Asp Arg Ile Leu Trp Asp Val Gly	
	130                      135                      140	
60	cat cag tct tat cct cac aaa atc ttg act ggt aga agg gac aag atg	480
	His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Met	
	145                      150                      155                      160	
65	tcg aca tta agg cag aca gat ggt ctt gca gga ttt act aag cga tcg	528

141

	Ser Thr Leu Arg Gln Thr Asp Gly Leu Ala Gly Phe Thr Lys Arg Ser	
	165 170 175	
5	gag agt gaa tat gat tgc ttt ggc acc ggc cac agt tcc acc acc atc Glu Ser Glu Tyr Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr Ile	576
	180 185 190	
10	tca gca ggc cta ggg atg gct gtt ggt aga gat cta aaa gga aga aac Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Arg Asn	624
	195 200 205	
15	aac aat gtt att gcc gta ata ggt gat ggt gcc atg aca gca ggt caa Asn Asn Val Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly Gln	672
	210 215 220	
20	gct tat gaa gcc atg aat aat gct ggt tac ctg gac tct gac atg att Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met Ile	720
	225 230 235 240	
25	ggt atc tta aac gac aat aga caa gtt tct tta cct act gct act ctg Val Ile Leu Asn Asp Asn Arg Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr Leu	768
	245 250 255	
30	gat ggg cca gtt gct cct gtt gga gct cta agt agt gct ttg agc agg Asp Gly Pro Val Ala Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser Arg	816
	260 265 270	
35	tta cag tct aat agg cct ctc aga gaa cta aga gaa gtc gca aag gga Leu Gln Ser Asn Arg Pro Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys Gly	864
	275 280 285	
40	ggt act aag cag att ggt ggt cct atg cat gag ctt gct gca aaa gtt Val Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Glu Leu Ala Ala Lys Val	912
	290 295 300	
45	gat gaa tat gct cgt ggc atg att agt ggt tct gga tca aca ttg ttt Asp Glu Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Leu Phe	960
	305 310 315 320	
50	gaa gaa ctt gga ctt tac tat att ggt cct gtg gat ggt cac aac att Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn Ile	1008
	325 330 335	
55	gat gat cta att gcg att ctc aaa gag gtt aga agt act aaa aca aca Asp Asp Leu Ile Ala Ile Leu Lys Glu Val Arg Ser Thr Lys Thr Thr	1056
	340 345 350	
60	ggt cca gta ctg atc cat gtt gtc act gag aaa ggc aga ggt tat cca Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr Pro	1104
	355 360 365	
65	tat gct gag aga gct gca gat aag tat cat gga gtt gcc aag ttt gat Tyr Ala Glu Arg Ala Ala Asp Lys Tyr His Gly Val Ala Lys Phe Asp	1152
	370 375 380	

	cca gca aca gga aag caa ttc aaa gcc agt gcc aag aca cag tcc tat	1200
	Pro Ala Thr Gly Lys Gln Phe Lys Ala Ser Ala Lys Thr Gln Ser Tyr	
	385 390 395 400	
5	aca aca tat ttt gcc gag gct tta att gca gaa gca gaa gca gat aaa	1248
	Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ile Ala Glu Ala Glu Ala Asp Lys	
	405 410 415	
10	gac att gtt gca atc cat gct gcc atg ggg ggt ggg acc gga atg aac	1296
	Asp Ile Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Gly Thr Gly Met Asn	
	420 425 430	
15	ctt ttc cat cgt cgc ttc cca aca agg tgt ttt gat gtt gga ata gca	1344
	Leu Phe His Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile Ala	
	435 440 445	
20	gaa caa cat gca gta acc ttt gct gct gga ttg gct tgt gaa ggc att	1392
	Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly Ile	
	450 455 460	
25	aaa cct ttc tgt gca atc tat tct ttc atg cag agg gct tat gac	1440
	Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr Asp	
	465 470 475 480	
30	cag gta gtg cat gac gtt gat ttg caa aag ctg ccc gtg agg ttt gca	1488
	Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe Ala	
	485 490 495	
35	atg gac aga gca ggt ctt gtt gga gca gat ggt cca aca cat tgt ggt	1536
	Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys Gly	
	500 505 510	
40	gca ttt gat gtt act tac atg gca tgt ctt cct aac atg gtt gta atg	1584
	Ala Phe Asp Val Thr Tyr Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Val Val Met	
	515 520 525	
45	gct cct tct gat gaa gcg gag cta ttt cac atg gta gca act gct gcc	1632
	Ala Pro Ser Asp Glu Ala Glu Leu Phe His Met Val Ala Thr Ala Ala	
	530 535 540	
50	gcc att gat gac aga cca agt tgt ttt aga tac cca aga gga aat ggg	1680
	Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn Gly	
	545 550 555 560	
55	atc ggt gta gag ctt ccg gct gga aac aaa gga att cct ctt gag gtt	1728
	Ile Gly Val Glu Leu Pro Ala Gly Asn Lys Gly Ile Pro Leu Glu Val	
	565 570 575	
60	ggt aaa ggt agg ata ttg att gag ggg gag aga gtg gct cta ttg gga	1776
	Gly Lys Gly Arg Ile Leu Ile Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu Gly	
	580 585 590	
65	tat ggc tca gca gtg cag aac tgt ttg gat gct gct att gtg cta gaa	1824

## 143

	Tyr Gly Ser Ala Val Gln Asn Cys Leu Asp Ala Ala Ile Val Leu Glu	
	595 600 605	
5	tcc cgc ggc tta caa gta aca gtt gca gat gca cgt ttc tgc aaa cca Ser Arg Gly Leu Gln Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys Pro	1872
	610 615 620	
10	ctg gac cat gcc ctc ata agg agc ctt gca aaa tca cat gaa gtg cta Leu Asp His Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val Leu	1920
	625 630 635 640	
15	atc act gtc gaa gaa gga tca att gga ggt ttt gga tct cat gtt gtt Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val Val	1968
	645 650 655	
20	cag ttc atg gcc tta gat ggg ctt ctt gat ggc aag ttg aag tgg aga Gln Phe Met Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp Arg	2016
	660 665 670	
25	cca ata gtt ctt cct gat cga tac att gac cat gga tct cct gtt gat Pro Ile Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ser Pro Val Asp	2064
	675 680 685	
30	cag ttg gcg gaa gct ggc cta aca cca tct cac att gca gca aca gta Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Thr Pro Ser His Ile Ala Ala Thr Val	2112
	690 695 700	
35	ttt aac ata ctt gga caa acc aga gag gct cta gag gtc atg aca taa Phe Asn Ile Leu Gly Gln Thr Arg Glu Ala Leu Glu Val Met Thr	2160
	705 710 715	
40	<210> 116	
	<211> 719	
	<212> PRT	
	<213> Lycopersicon esculentum	
45	<400> 116	
	Met Ala Leu Cys Ala Tyr Ala Phe Pro Gly Ile Leu Asn Arg Thr Gly	
	1 5 10 15	
50	Val Val Ser Asp Ser Ser Lys Ala Thr Pro Leu Phe Ser Gly Trp Ile	
	20 25 30	
	His Gly Thr Asp Leu Gln Phe Leu Phe Gln His Lys Leu Thr His Glu	
	35 40 45	

Val Lys Lys Arg Ser Arg Val Val Gln Ala Ser Leu Ser Glu Ser Gly  
 50 55 60  
 5

Glu Tyr Tyr Thr Gln Arg Pro Pro Thr Pro Ile Leu Asp Thr Val Asn  
 65 70 75 80

10 Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Leu Lys Glu Leu Lys Gln Leu  
 85 90 95

15 Ala Asp Glu Leu Arg Ser Asp Thr Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr Gly  
 100 105 110

20 Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu  
 115 120 125

His Tyr Val Phe Asn Ala Pro Gln Asp Arg Ile Leu Trp Asp Val Gly  
 130 135 140  
 25

His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Met  
 145 150 155 160

30 Ser Thr Leu Arg Gln Thr Asp Gly Leu Ala Gly Phe Thr Lys Arg Ser  
 165 170 175

35 Glu Ser Glu Tyr Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr Ile  
 180 185 190

40 Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Arg Asn  
 195 200 205

Asn Asn Val Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly Gln  
 210 215 220  
 45

Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met Ile  
 225 230 235 240

50 Val Ile Leu Asn Asp Asn Arg Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr Leu  
 245 250 255

## 145

Asp Gly Pro Val Ala Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser Arg  
 260 265 270

5 Leu Gln Ser Asn Arg Pro Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys Gly  
 275 280 285

10 Val Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Glu Leu Ala Ala Lys Val  
 290 295 300

15 Asp Glu Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Leu Phe  
 305 310 315 320

Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn Ile  
 325 330 335

20 Asp Asp Leu Ile Ala Ile Leu Lys Glu Val Arg Ser Thr Lys Thr Thr  
 340 345 350

25 Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr Pro  
 355 360 365

30 Tyr Ala Glu Arg Ala Ala Asp Lys Tyr His Gly Val Ala Lys Phe Asp  
 370 375 380

35 Pro Ala Thr Gly Lys Gln Phe Lys Ala Ser Ala Lys Thr Gln Ser Tyr  
 385 390 395 400

Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ile Ala Glu Ala Glu Ala Asp Lys  
 405 410 415

40 Asp Ile Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Gly Thr Gly Met Asn  
 420 425 430

45 Leu Phe His Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile Ala  
 435 440 445

50 Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly Ile  
 450 455 460

Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr Asp  
 465 470 475 480



5      Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe Ala  
                                  485                                   490                                   495  
  
 10      Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys Gly  
                                  500                                   505                                   510  
  
 15      Ala Phe Asp Val Thr Tyr Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Val Val Met  
                                  515                                   520                                   525  
  
 20      Ala Pro Ser Asp Glu Ala Glu Leu Phe His Met Val Ala Thr Ala Ala  
                                  530                                   535                                   540  
  
 25      Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn Gly  
                                  545                                   550                                   555                                   560  
  
             Ile Gly Val Glu Leu Pro Ala Gly Asn Lys Gly Ile Pro Leu Glu Val  
                                  565                                   570                                   575  
  
 30      Gly Lys Gly Arg Ile Leu Ile Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu Gly  
                                  580                                   585                                   590  
  
             Tyr Gly Ser Ala Val Gln Asn Cys Leu Asp Ala Ala Ile Val Leu Glu  
                                  595                                   600                                   605  
  
 35      Ser Arg Gly Leu Gln Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys Pro  
                                  610                                   615                                   620  
  
 40      Leu Asp His Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val Leu  
                                  625                                   630                                   635                                   640  
  
             Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val Val  
                                  645                                   650                                   655  
  
 45      Gln Phe Met Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp Arg  
                                  660                                   665                                   670  
  
 50      Pro Ile Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ser Pro Val Asp  
                                  675                                   680                                   685

Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Thr Pro Ser His Ile Ala Ala Thr Val  
 690 695 700

5 Phe Asn Ile Leu Gly Gln Thr Arg Glu Ala Leu Glu Val Met Thr  
 705 710 715

10 <210> 117

<211> 1434

<212> DNA

15 <213> Arabidopsis thaliana

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1434)

25 <223>

30 <400> 117  
 atg atg aca tta aac tca cta tct cca gct gaa tcc aaa gct att tct 48  
 Met Met Thr Leu Asn Ser Leu Ser Pro Ala Glu Ser Lys Ala Ile Ser  
 1 5 10 15

35 ttc ttg gat acc tcc agg ttc aat cca atc cct aaa ctc tca ggt ggg 96  
 Phe Leu Asp Thr Ser Arg Phe Asn Pro Ile Pro Lys Leu Ser Gly Gly  
 20 25 30

40 ttt agt ttg agg agg agg aat caa ggg aga ggt ttt gga aaa ggt gtt 144  
 Phe Ser Leu Arg Arg Arg Asn Gln Gly Arg Gly Phe Gly Lys Gly Val  
 35 40 45

aag tgt tca gtg aaa gtg cag cag caa caa cca cct cct cca gca tgg 192  
 Lys Cys Ser Val Lys Val Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Ala Trp  
 50 55 60

45 cct ggg aga gct gtc cct gag gcg cct cgt caa tct tgg gat gga cca 240  
 Pro Gly Arg Ala Val Pro Glu Ala Pro Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro  
 65 70 75 80

50 aaa ccc atc tct atc gtt gga tct act ggt tct att ggc act cag aca 288  
 Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly Ser Thr Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr  
 85 90 95

ttg gat att gtg gct gag aat cct gac aaa ttc aga gtt gtg gct cta 336

## 148

	Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn Pro Asp Lys Phe Arg Val Val Ala Leu	
	100 105 110	
5	gct gct ggt tcg aat gtt act cta ctt gct gat cag gta agg aga ttt Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr Leu Leu Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe	384
	115 120 125	
10	aag cct gca ttg gtt gct gtt aga aac gag tca ctg att aat gag ctt Lys Pro Ala Leu Val Ala Val Arg Asn Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu	432
	130 135 140	
15	aaa gag gct tta gct gat ttg gac tat aaa ctc gag att att cca gga Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu Asp Tyr Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly	480
	145 150 155 160	
20	gag caa gga gtg att gag gtt gcc cga cat cct gaa gct gta acc gtt Glu Gln Gly Val Ile Glu Val Ala Arg His Pro Glu Ala Val Thr Val	528
	165 170 175	
25	gtt acc gga ata gta ggt tgt gcg gga cta aag cct acg gtt gct gca Val Thr Gly Ile Val Gly Cys Ala Gly Leu Lys Pro Thr Val Ala Ala	576
	180 185 190	
30	att gaa gca gga aag gac att gct ctt gca aac aaa gag aca tta atc Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile Ala Leu Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile	624
	195 200 205	
35	<del>gca ggt ggt cct ttc gtg ctt ccg ctt gcc aac aaa cat aat gta aag</del> <del>Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu Pro Leu Ala Asn Lys His Asn Val Lys</del>	<del>672</del>
	<del>210 215 220</del>	
40	att ctt ccg gca gat tca gaa cat tct gcc ata ttt cag tgt att caa Ile Leu Pro Ala Asp Ser Glu His Ser Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln	720
	225 230 235 240	
45	ggt ttg cct gaa ggc gct ctg cgc aag ata atc ttg act gca tct ggt Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu Arg Lys Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly	768
	245 250 255	
50	gga gct ttt agg gat tgg cct gtc gaa aag cta aag gaa gtt aaa gta Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro Val Glu Lys Leu Lys Glu Val Lys Val	816
	260 265 270	
55	gcg gat gcg ttg aag cat cca aac tgg aac atg gga aag aaa atc act Ala Asp Ala Leu Lys His Pro Asn Trp Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr	864
	275 280 285	
60	gtg gac tct gct acg ctt ttc aac aag ggt ctt gag gtc att gaa gcg Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe Asn Lys Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala	912
	290 295 300	
65	cat tat ttg ttt gga gct gag tat gac gat ata gag att gtc att cat His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Ile Glu Ile Val Ile His	960
	305 310 315 320	

	ccg caa agt atc ata cat tcc atg att gaa aca cag gat tca tct gtg	1008
	Pro Gln Ser Ile Ile His Ser Met Ile Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val	
	325 330 335	
5	ctt gct caa ttg ggt tgg cct gat atg cgt tta ccg att ctc tac acc	1056
	Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro Asp Met Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr	
	340 345 350	
10	atg tca tgg ccc gat aga gtt cct tgt tct gaa gta act tgg cca aga	1104
	Met Ser Trp Pro Asp Arg Val Pro Cys Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg	
	355 360 365	
15	ctt gac ctt tgc aaa ctc ggt tca ttg act ttc aag aaa cca gac aat	1152
	Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly Ser Leu Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn	
	370 375 380	
20	gtg aaa tac cca tcc atg gat ctt gct tat gct gct gga cga gct gga	1200
	Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp Leu Ala Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly	
	385 390 395 400	
	ggc aca atg act gga gtt ctc agc gcc gcc aat gag aaa gct gtt gaa	1248
	Gly Thr Met Thr Gly Val Leu Ser Ala Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu	
	405 410 415	
25	atg ttc att gat gaa aag ata agc tat ttg gat atc ttc aag gtt gtg	1296
	Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile Ser Tyr Leu Asp Ile Phe Lys Val Val	
	420 425 430	
30	gaa tta aca tgc gat aaa cat cga aac gag ttg gta aca tca ccg tct	1344
	Glu Leu Thr Cys Asp Lys His Arg Asn Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser	
	435 440 445	
35	ctt gaa gag att gtt cac tat gac ttg tgg gca cgt gaa tat gcc gcg	1392
	Leu Glu Glu Ile Val His Tyr Asp Leu Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala	
	450 455 460	
40	aat gtg cag ctt tct tct ggt gct agg cca gtt cat gca tga	1434
	Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly Ala Arg Pro Val His Ala	
	465 470 475	
	<210> 118	
45	<211> 477	
	<212> PRT	
	<213> Arabidopsis thaliana	
50	<400> 118	

## 150

	Met	Met	Thr	Leu	Asn	Ser	Leu	Ser	Pro	Ala	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	
	1				5					10					15		
5	Phe	Leu	Asp	Thr	Ser	Arg	Phe	Asn	Pro	Ile	Pro	Lys	Leu	Ser	Gly	Gly	
				20					25					30			
10	Phe	Ser	Leu	Arg	Arg	Arg	Asn	Gln	Gly	Arg	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Val	
			35					40					45				
15	Lys	Cys	Ser	Val	Lys	Val	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Pro	Pro	Pro	Ala	Trp	
		50					55					60					
20	Pro	Gly	Arg	Ala	Val	Pro	Glu	Ala	Pro	Arg	Gln	Ser	Trp	Asp	Gly	Pro	
	65					70					75					80	
25	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile	Val	Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	Ile	Gly	Thr	Gln	Thr	
					85					90					95		
30	Ala	Ala	Gly	Ser	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Ala	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	Phe	
			115					120					125				
35	Lys	Pro	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Arg	Asn	Glu	Ser	Leu	Ile	Asn	Glu	Leu	
		130					135					140					
40	Lys	Glu	Ala	Leu	Ala	Asp	Leu	Asp	Tyr	Lys	Leu	Glu	Ile	Ile	Pro	Gly	
	145					150					155					160	
45	Glu	Gln	Gly	Val	Ile	Glu	Val	Ala	Arg	His	Pro	Glu	Ala	Val	Thr	Val	
					165					170					175		
50	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Gly	Cys	Ala	Gly	Leu	Lys	Pro	Thr	Val	Ala	Ala	
				180					185					190			
55	Ile	Glu	Ala	Gly	Lys	Asp	Ile	Ala	Leu	Ala	Asn	Lys	Glu	Thr	Leu	Ile	
			195					200					205				
60	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Asn	Lys	His	Asn	Val	Lys	
		210					215					220					

	Ile	Leu	Pro	Ala	Asp	Ser	Glu	His	Ser	Ala	Ile	Phe	Gln	Cys	Ile	Gln	
	225						230					235				240	
5																	
	Gly	Leu	Pro	Glu	Gly	Ala	Leu	Arg	Lys	Ile	Ile	Leu	Thr	Ala	Ser	Gly	
					245					250					255		
10																	
	Gly	Ala	Phe	Arg	Asp	Trp	Pro	Val	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu	Val	Lys	Val	
				260					265					270			
15																	
	Ala	Asp	Ala	Leu	Lys	His	Pro	Asn	Trp	Asn	Met	Gly	Lys	Lys	Ile	Thr	
			275					280					285				
20																	
	Val	Asp	Ser	Ala	Thr	Leu	Phe	Asn	Lys	Gly	Leu	Glu	Val	Ile	Glu	Ala	
		290					295					300					
25																	
	His	Tyr	Leu	Phe	Gly	Ala	Glu	Tyr	Asp	Asp	Ile	Glu	Ile	Val	Ile	His	
	305					310					315					320	
30																	
	Pro	Gln	Ser	Ile	Ile	His	Ser	Met	Ile	Glu	Thr	Gln	Asp	Ser	Ser	Val	
				325						330					335		
35																	
	Leu	Ala	Gln	Leu	Gly	Trp	Pro	Asp	Met	Arg	Leu	Pro	Ile	Leu	Tyr	Thr	
			340						345					350			
40																	
	Met	Ser	Trp	Pro	Asp	Arg	Val	Pro	Cys	Ser	Glu	Val	Thr	Trp	Pro	Arg	
			355					360					365				
45																	
	Leu	Asp	Leu	Cys	Lys	Leu	Gly	Ser	Leu	Thr	Phe	Lys	Lys	Pro	Asp	Asn	
		370					375					380					
50																	
	Val	Lys	Tyr	Pro	Ser	Met	Asp	Leu	Ala	Tyr	Ala	Ala	Gly	Arg	Ala	Gly	
	385					390					395					400	
55																	
	Gly	Thr	Met	Thr	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	Asn	Glu	Lys	Ala	Val	Glu	
					405					410					415		
60																	
	Met	Phe	Ile	Asp	Glu	Lys	Ile	Ser	Tyr	Leu	Asp	Ile	Phe	Lys	Val	Val	
				420					425					430			

## 152

Glu Leu Thr Cys Asp Lys His Arg Asn Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser  
 435 440 445

5 Leu Glu Glu Ile Val His Tyr Asp Leu Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala  
 450 455 460

10 Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly Ala Arg Pro Val His Ala  
 465 470 475

<210> 119

15 <211> 884

<212> DNA

20 <213> Adonis palaestina clone ApIPI28

<220>

25 <221> CDS

<222> (180)..(884)

<223>

30

<400> 119

35 cgtcgatcag gattaatcct ttatatagta tcttctccac caccactaaa acattatcag 60

cttcgtgttc ttctcccgct gttcatcttc agcagcggtg tcgtactctt tctatttctt 120

cttccatcac taacagtcct cgccgagggt tgaatcggct gttcgcctca acgtcgact 179

40 atg ggt gaa gtc gct gat gct ggt atg gat gcc gtc cag aag cgg ctt 227

Met Gly Glu Val Ala Asp Ala Gly Met Asp Ala Val Gln Lys Arg Leu  
 1 5 10 15

45 atg ttc gac gat gaa tgt att ttg gtg gat gag aat gac aag gtc gtc 275

Met Phe Asp Asp Glu Cys Ile Leu Val Asp Glu Asn Asp Lys Val Val  
 20 25 30

gga cat gat tcc aaa tac aac tgt cat ttg atg gaa aag ata gag gca 323

50 Gly His Asp Ser Lys Tyr Asn Cys His Leu Met Glu Lys Ile Glu Ala  
 35 40 45

gaa aac ttg ctt cac aga gcc ttc agt gtt ttc tta ttc aac tca aaa 371

Glu Asn Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asn Ser Lys  
 50 55 60

	tac gag ttg ctt ctt cag caa cga tct gca acg aag gta aca ttc ccg	419
	Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ser Ala Thr Lys Val Thr Phe Pro	
	65 70 75 80	
5	ctc gta tgg aca aac acc tgt tgc agc cat ccc ctc ttc cgt gat tcc	467
	Leu Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Phe Arg Asp Ser	
	85 90 95	
10	gaa ctc ata gaa gaa aat ttt ctc ggg gta cga aac gct gca caa agg	515
	Glu Leu Ile Glu Glu Asn Phe Leu Gly Val Arg Asn Ala Ala Gln Arg	
	100 105 110	
15	aag ctt tta gac gag cta ggc att cca gct gaa gac gta cca gtt gat	563
	Lys Leu Leu Asp Glu Leu Gly Ile Pro Ala Glu Asp Val Pro Val Asp	
	115 120 125	
20	gaa ttc act cct ctt ggt cgc att ctt tac aaa gct cca tct gac gga	611
	Glu Phe Thr Pro Leu Gly Arg Ile Leu Tyr Lys Ala Pro Ser Asp Gly	
	130 135 140	
25	aaa tgg gga gag cac gaa ctg gac tat ctt ctg ttt att gtc cga gat	659
	Lys Trp Gly Glu His Glu Leu Asp Tyr Leu Leu Phe Ile Val Arg Asp	
	145 150 155 160	
30	gtg aaa tac gat cca aac cca gat gaa gtt gct gac gct aag tac gtt	707
	Val Lys Tyr Asp Pro Asn Pro Asp Glu Val Ala Asp Ala Lys Tyr Val	
	165 170 175	
35	aat cgc gag gag ttg aaa gag ata ctg aga aaa gct gat gca ggt gaa	755
	Asn Arg Glu Glu Leu Lys Glu Ile Leu Arg Lys Ala Asp Ala Gly Glu	
	180 185 190	
40	gag gga ata aag ttg tct cct tgg ttt aga ttg gtt gtg gat aac ttt	803
	Glu Gly Ile Lys Leu Ser Pro Trp Phe Arg Leu Val Val Asp Asn Phe	
	195 200 205	
45	ttg ttc aag tgg tgg gat cat gta gag gag ggg aag att aag gac gtc	851
	Leu Phe Lys Trp Trp Asp His Val Glu Glu Gly Lys Ile Lys Asp Val	
	210 215 220	
50	gcc gac atg aaa act atc cac aag ttg act taa	884
	Ala Asp Met Lys Thr Ile His Lys Leu Thr	
	225 230	
	<210> 120	
	<211> 234	
	<212> PRT	
	<213> Adonis palaestina clone ApIPI28	



&lt;400&gt; 120

5 Met Gly Glu Val Ala Asp Ala Gly Met Asp Ala Val Gln Lys Arg Leu  
 1 5 10 15  
 10 Met Phe Asp Asp Glu Cys Ile Leu Val Asp Glu Asn Asp Lys Val Val  
 20 25 30  
 15 Gly His Asp Ser Lys Tyr Asn Cys His Leu Met Glu Lys Ile Glu Ala  
 35 40 45  
 20 Glu Asn Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asn Ser Lys  
 50 55 60  
 25 Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ser Ala Thr Lys Val Thr Phe Pro  
 65 70 75 80  
 30 Leu Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Phe Arg Asp Ser  
 85 90 95  
 35 Glu Leu Ile Glu Glu Asn Phe Leu Gly Val Arg Asn Ala Ala Gln Arg  
 100 105 110  
 40 Lys Leu Leu Asp Glu Leu Gly Ile Pro Ala Glu Asp Val Pro Val Asp  
 115 120 125  
 45 Glu Phe Thr Pro Leu Gly Arg Ile Leu Tyr Lys Ala Pro Ser Asp Gly  
 130 135 140  
 50 Lys Trp Gly Glu His Glu Leu Asp Tyr Leu Leu Phe Ile Val Arg Asp  
 145 150 155 160  
 55 Val Lys Tyr Asp Pro Asn Pro Asp Glu Val Ala Asp Ala Lys Tyr Val  
 165 170 175  
 60 Asn Arg Glu Glu Leu Lys Glu Ile Leu Arg Lys Ala Asp Ala Gly Glu  
 180 185 190  
 65 Glu Gly Ile Lys Leu Ser Pro Trp Phe Arg Leu Val Val Asp Asn Phe  
 195 200 205

5 Leu Phe Lys Trp Trp Asp His Val Glu Glu Gly Lys Ile Lys Asp Val  
 210 215 220

10 Ala Asp Met Lys Thr Ile His Lys Leu Thr  
 225 230

15 <210> 121  
 <211> 1402  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana

20 <220>  
 <221> CDS

25 <222> (52) .. (1317)  
 <223>

30 <400> 121  
 aagtcctttgc ctcttttggtt tacttttcctc tgttttcgat ccatttagaa a atg tta 57  
 Met Leu  
 1

35 ttc acg agg agt gtt gct cgg att tct tct aag ttt ctg aga aac cgt 105  
 Phe Thr Arg Ser Val Ala Arg Ile Ser Ser Lys Phe Leu Arg Asn Arg  
 5 10 15

40 agc ttc tat ggc tcc tct caa tct ctc gcc tct cat cgg ttc gca atc 153  
 Ser Phe Tyr Gly Ser Ser Gln Ser Leu Ala Ser His Arg Phe Ala Ile  
 20 25 30

45 att ccc gat cag ggt cac tct tgt tct gac tct cca cac aag ggt tac 201  
 Ile Pro Asp Gln Gly His Ser Cys Ser Asp Ser Pro His Lys Gly Tyr  
 35 40 45 50

50 gtt tgc aga aca act tat tca ttg aaa tct ccg gtt ttt ggt gga ttt 249  
 Val Cys Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Lys Ser Pro Val Phe Gly Gly Phe  
 55 60 65

agt cat caa ctc tat cac cag agt agc tcc ttg gtt gag gag gag ctt 297  
 Ser His Gln Leu Tyr His Gln Ser Ser Ser Leu Val Glu Glu Glu Leu  
 70 75 80

	gac cca ttt tcg ctt gtt gcc gat gag ctg tca ctt ctt agt aat aag	345
	Asp Pro Phe Ser Leu Val Ala Asp Glu Leu Ser Leu Leu Ser Asn Lys	
	85 90 95	
5	ttg aga gag atg gta ctt gcc gag gtt cca aag ctt gcc tct gct gct	393
	Leu Arg Glu Met Val Leu Ala Glu Val Pro Lys Leu Ala Ser Ala Ala	
	100 105 110	
10	gag tac ttc ttc aaa agg ggt gtg caa gga aaa cag ttt cgt tca act	441
	Glu Tyr Phe Phe Lys Arg Gly Val Gln Gly Lys Gln Phe Arg Ser Thr	
	115 120 125 130	
15	att ttg ctg ctg atg gcg aca gct ctg gat gta cga gtt cca gaa gca	489
	Ile Leu Leu Leu Met Ala Thr Ala Leu Asp Val Arg Val Pro Glu Ala	
	135 140 145	
20	ttg att ggg gaa tca aca gat ata gtc aca tca gaa tta cgc gta agg	537
	Leu Ile Gly Glu Ser Thr Asp Ile Val Thr Ser Glu Leu Arg Val Arg	
	150 155 160	
	caa cgg ggt att gct gaa atc act gaa atg ata cac gtc gca agt cta	585
	Gln Arg Gly Ile Ala Glu Ile Thr Glu Met Ile His Val Ala Ser Leu	
	165 170 175	
25	ctg cac gat gat gtc ttg gat gat gcc gat aca agg cgt ggt gtt ggt	633
	Leu His Asp Asp Val Leu Asp Asp Ala Asp Thr Arg Arg Gly Val Gly	
	180 185 190	
30	tcc tta aat gtt gta atg ggt aac aag atg tcg gta tta gca gga gac	681
	Ser Leu Asn Val Val Met Gly Asn Lys Met Ser Val Leu Ala Gly Asp	
	195 200 205 210	
35	ttc ttg ctc tcc cgg gct tgt ggg gct ctc gct gct tta aag aac aca	729
	Phe Leu Leu Ser Arg Ala Cys Gly Ala Leu Ala Ala Leu Lys Asn Thr	
	215 220 225	
40	gag gtt gta gca tta ctt gca act gct gta gaa cat ctt gtt acc ggt	777
	Glu Val Val Ala Leu Leu Ala Thr Ala Val Glu His Leu Val Thr Gly	
	230 235 240	
	gaa acc atg gag ata act agt tca acc gag cag cgt tat agt atg gac	825
	Glu Thr Met Glu Ile Thr Ser Ser Thr Glu Gln Arg Tyr Ser Met Asp	
	245 250 255	
45	tac tac atg cag aag aca tat tat aag aca gca tcg cta atc tct aac	873
	Tyr Tyr Met Gln Lys Thr Tyr Tyr Lys Thr Ala Ser Leu Ile Ser Asn	
	260 265 270	
50	agc tgc aaa gct gtt gcc gtt ctc act gga caa aca gca gaa gtt gcc	921
	Ser Cys Lys Ala Val Ala Val Leu Thr Gly Gln Thr Ala Glu Val Ala	
	275 280 285 290	
	gtg tta gct ttt gag tat ggg agg aat ctg ggt tta gca ttc caa tta	969

## 157

	Val	Leu	Ala	Phe	Glu	Tyr	Gly	Arg	Asn	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe	Gln	Leu	
					295					300					305		
5	ata	gac	gac	att	ctt	gat	ttc	acg	ggc	aca	tct	gcc	tct	ctc	gga	aag	1017
	Ile	Asp	Asp	Ile	Leu	Asp	Phe	Thr	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Lys	
				310					315					320			
10	gga	tcg	ttg	tca	gat	att	cgc	cat	gga	gtc	ata	aca	gcc	cca	atc	ctc	1065
	Gly	Ser	Leu	Ser	Asp	Ile	Arg	His	Gly	Val	Ile	Thr	Ala	Pro	Ile	Leu	
			325				330						335				
15	ttt	gcc	atg	gaa	gag	ttt	cct	caa	cta	cgc	gaa	gtt	gtt	gat	caa	gtt	1113
	Phe	Ala	Met	Glu	Glu	Phe	Pro	Gln	Leu	Arg	Glu	Val	Val	Asp	Gln	Val	
		340					345					350					
20	gaa	aaa	gat	cct	agg	aat	gtt	gac	att	gct	tta	gag	tat	ctt	ggg	aag	1161
	Glu	Lys	Asp	Pro	Arg	Asn	Val	Asp	Ile	Ala	Leu	Glu	Tyr	Leu	Gly	Lys	
		355				360					365				370		
25	agc	aag	gga	ata	cag	agg	gca	aga	gaa	tta	gcc	atg	gaa	cat	gcg	aat	1209
	Ser	Lys	Gly	Ile	Gln	Arg	Ala	Arg	Glu	Leu	Ala	Met	Glu	His	Ala	Asn	
					375					380				385			
30	cta	gca	gca	gct	gca	atc	ggg	tct	cta	cct	gaa	aca	gac	aat	gaa	gat	1257
	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ile	Gly	Ser	Leu	Pro	Glu	Thr	Asp	Asn	Glu	Asp	
				390					395					400			
35	gtc	aaa	aga	tcg	agg	cgg	gca	ctt	att	gac	ttg	acc	cat	aga	gtc	atc	1305
	Val	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Ala	Leu	Ile	Asp	Leu	Thr	His	Arg	Val	Ile	
			405				410					415					
40	acc	aga	aac	aag	tgagattaag	taatgtttct	ctctatacac	caaaacattc									1357
	Thr	Arg	Asn	Lys													
			420														
45	ctcatttcat	ttgtaggatt	ttgttggtcc	aattcgtttc	acgaa												1402
50	<210>	122															
	<211>	422															
	<212>	PRT															
	<213>	Arabidopsis thaliana															
	<400>	122															
	Met	Leu	Phe	Thr	Arg	Ser	Val	Ala	Arg	Ile	Ser	Ser	Lys	Phe	Leu	Arg	
	1				5					10				15			

	Asn	Arg	Ser	Phe	Tyr	Gly	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Ala	Ser	His	Arg	Phe	
				20					25					30			
5	Ala	Ile	Ile	Pro	Asp	Gln	Gly	His	Ser	Cys	Ser	Asp	Ser	Pro	His	Lys	
			35					40					45				
10	Gly	Tyr	Val	Cys	Arg	Thr	Thr	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ser	Pro	Val	Phe	Gly	
		50					55					60					
15	Gly	Phe	Ser	His	Gln	Leu	Tyr	His	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Val	Glu	Glu	
	65					70					75				80		
20	Glu	Leu	Asp	Pro	Phe	Ser	Leu	Val	Ala	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Leu	Ser	
					85					90					95		
25	Asn	Lys	Leu	Arg	Glu	Met	Val	Leu	Ala	Glu	Val	Pro	Lys	Leu	Ala	Ser	
				100						105					110		
30	Ala	Ala	Glu	Tyr	Phe	Phe	Lys	Arg	Gly	Val	Gln	Gly	Lys	Gln	Phe	Arg	
			115						120				125				
35	Ser	Thr	Ile	Leu	Leu	Leu	Met	Ala	Thr	Ala	Leu	Asp	Val	Arg	Val	Pro	
		130					135					140					
40	Glu	Ala	Leu	Ile	Gly	Glu	Ser	Thr	Asp	Ile	Val	Thr	Ser	Glu	Leu	Arg	
	145					150					155				160		
45	Val	Arg	Gln	Arg	Gly	Ile	Ala	Glu	Ile	Thr	Glu	Met	Ile	His	Val	Ala	
					165					170					175		
50	Ser	Leu	Leu	His	Asp	Asp	Val	Leu	Asp	Asp	Ala	Asp	Thr	Arg	Arg	Gly	
				180					185					190			
55	Val	Gly	Ser	Leu	Asn	Val	Val	Met	Gly	Asn	Lys	Met	Ser	Val	Leu	Ala	
				195				200					205				
60	Gly	Asp	Phe	Leu	Leu	Ser	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Lys	
		210					215					220					
65	Asn	Thr	Glu	Val	Val	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Ala	Val	Glu	His	Leu	Val	
	225					230					235				240		

Thr Gly Glu Thr Met Glu Ile Thr Ser Ser Thr Glu Gln Arg Tyr Ser  
 245 250 255  
 5  
 Met Asp Tyr Tyr Met Gln Lys Thr Tyr Tyr Lys Thr Ala Ser Leu Ile  
 260 265 270  
 10  
 Ser Asn Ser Cys Lys Ala Val Ala Val Leu Thr Gly Gln Thr Ala Glu  
 275 280 285  
 15 Val Ala Val Leu Ala Phe Glu Tyr Gly Arg Asn Leu Gly Leu Ala Phe  
 290 295 300  
 20 Gln Leu Ile Asp Asp Ile Leu Asp Phe Thr Gly Thr Ser Ala Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Gly Ser Leu Ser Asp Ile Arg His Gly Val Ile Thr Ala Pro  
 325 330 335  
 25 Ile Leu Phe Ala Met Glu Glu Phe Pro Gln Leu Arg Glu Val Val Asp  
 340 345 350  
 30 Gln Val Glu Lys Asp Pro Arg Asn Val Asp Ile Ala Leu Glu Tyr Leu  
 355 360 365  
 35 Gly Lys Ser Lys Gly Ile Gln Arg Ala Arg Glu Leu Ala Met Glu His  
 370 375 380  
 40 Ala Asn Leu Ala Ala Ala Ala Ile Gly Ser Leu Pro Glu Thr Asp Asn  
 385 390 395 400  
 Glu Asp Val Lys Arg Ser Arg Arg Ala Leu Ile Asp Leu Thr His Arg  
 405 410 415  
 45 Val Ile Thr Arg Asn Lys  
 420  
 50  
 <210> 123  
 <211> 1155

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

10

&lt;222&gt; (1)..(1155)

&lt;223&gt;

15

&lt;400&gt; 123

atg agt gtg agt tgt tgt tgt agg aat ctg ggc aag aca ata aaa aag	48
Met Ser Val Ser Cys Cys Cys Arg Asn Leu Gly Lys Thr Ile Lys Lys	
1 5 10 15	

20

gca ata cct tca cat cat ttg cat ctg aga agt ctt ggt ggg agt ctc	96
Ala Ile Pro Ser His His Leu His Leu Arg Ser Leu Gly Gly Ser Leu	
20 25 30	

25

tat cgt cgt cgt atc caa agc tct tca atg gag acc gat ctc aag tca	144
Tyr Arg Arg Arg Ile Gln Ser Ser Ser Met Glu Thr Asp Leu Lys Ser	
35 40 45	

30

acc ttt ctc aac gtt tat tct gtt ctc aag tct gac ctt ctt cat gac	192
Thr Phe Leu Asn Val Tyr Ser Ser Val Leu Lys Ser Asp Leu Leu His Asp	
50 55 60	

35

cct tcc ttc gaa ttc acc aat gaa tct cgt ctc tgg gtt gat cgg atg	240
Pro Ser Phe Glu Phe Thr Asn Glu Ser Arg Leu Trp Val Asp Arg Met	
65 70 75 80	

40

ctg gac tac aat gta cgt gga ggg aaa ctc aat cgg ggt ctc tct gtt	288
Leu Asp Tyr Asn Val Arg Gly Gly Lys Leu Asn Arg Gly Leu Ser Val	
85 90 95	

45

gtt gac agt ttc aaa ctt ttg aag caa ggc aat gat ttg act gag caa	336
Val Asp Ser Phe Lys Leu Leu Lys Gln Gly Asn Asp Leu Thr Glu Gln	
100 105 110	

gag gtt ttc ctc tct tgt gct ctc ggt tgg tgc att gaa tgg ctc caa	384
Glu Val Phe Leu Ser Cys Ala Leu Gly Trp Cys Ile Glu Trp Leu Gln	
115 120 125	

50

gct tat ttc ctt gtg ctt gat gat att atg gat aac tct gtc act cgc	432
Ala Tyr Phe Leu Val Leu Asp Asp Ile Met Asp Asn Ser Val Thr Arg	
130 135 140	

cgt ggt caa cct tgc tgg ttc aga gtt cct cag gtt ggt atg gtt gcc	480
---	-----

161

	Arg Gly Gln Pro Cys Trp Phe Arg Val Pro Gln Val Gly Met Val Ala	145	150	155	160
5	atc aat gat ggg att cta ctt cgc aat cac atc cac agg att ctc aaa Ile Asn Asp Gly Ile Leu Leu Arg Asn His Ile His Arg Ile Leu Lys	165	170	175	528
10	aag cat ttc cgt gat aag cct tac tat gtt gac ctt gtt gat ttg ttt Lys His Phe Arg Asp Lys Pro Tyr Tyr Val Asp Leu Val Asp Leu Phe	180	185	190	576
15	aat gag gtt gag ttg caa aca gct tgt ggc cag atg ata gat ttg atc Asn Glu Val Glu Leu Gln Thr Ala Cys Gly Gln Met Ile Asp Leu Ile	195	200	205	624
20	acc acc ttt gaa gga gaa aag gat ttg gcc aag tac tca ttg tca atc Thr Thr Phe Glu Gly Glu Lys Asp Leu Ala Lys Tyr Ser Leu Ser Ile	210	215	220	672
25	cac cgt cgt att gtc cag tac aaa acg gct tat tac tca ttt tat ctc His Arg Arg Ile Val Gln Tyr Lys Thr Ala Tyr Tyr Ser Phe Tyr Leu	225	230	235	720
30	cct gtt gct tgt gcg ttg ctt atg gcg ggc gaa aat ttg gaa aac cat Pro Val Ala Cys Ala Leu Leu Met Ala Gly Glu Asn Leu Glu Asn His	245	250	255	768
35	att gac gtg aaa aat gtt ctt gtt gac atg gga atc tac ttc caa gtg Ile Asp Val Lys Asn Val Leu Val Asp Met Gly Ile Tyr Phe Gln Val	260	265	270	816
40	cag gat gat tat ctg gat tgt ttt gct gat ccc gag acg ctt ggc aag Gln Asp Asp Tyr Leu Asp Cys Phe Ala Asp Pro Glu Thr Leu Gly Lys	275	280	285	864
45	ata gga aca gat ata gaa gat ttc aaa tgc tcg tgg ttg gtg gtt aag Ile Gly Thr Asp Ile Glu Asp Phe Lys Cys Ser Trp Leu Val Val Lys	290	295	300	912
50	gca tta gag cgc tgc agc gaa gaa caa act aag ata tta tat gag aac Ala Leu Glu Arg Cys Ser Glu Glu Gln Thr Lys Ile Leu Tyr Glu Asn	305	310	315	960
55	tat ggt aaa ccc gac cca tcg aac gtt gct aaa gtg aag gat ctc tac Tyr Gly Lys Pro Asp Pro Ser Asn Val Ala Lys Val Lys Asp Leu Tyr	325	330	335	1008
60	aaa gag ctg gat ctt gag gga gtt ttc atg gag tat gag agc aaa agc Lys Glu Leu Asp Leu Glu Gly Val Phe Met Glu Tyr Glu Ser Lys Ser	340	345	350	1056
65	tac gag aag ctg act gga gcg att gag gga cac caa agt aaa gca atc Tyr Glu Lys Leu Thr Gly Ala Ile Glu Gly His Gln Ser Lys Ala Ile	355	360	365	1104



caa gca gtg cta aaa tcc ttc ttg gct aag atc tac aag agg cag aag 1152  
 Gln Ala Val Leu Lys Ser Phe Leu Ala Lys Ile Tyr Lys Arg Gln Lys  
 370 375 380

5

tag 1155

10

<210> 124

<211> 384

<212> PRT

15

<213> Arabidopsis thaliana

20

<400> 124

Met Ser Val Ser Cys Cys Cys Arg Asn Leu Gly Lys Thr Ile Lys Lys  
 1 5 10 15

25

Ala Ile Pro Ser His His Leu His Leu Arg Ser Leu Gly Gly Ser Leu  
 20 25 30

30

Tyr Arg Arg Arg Ile Gln Ser Ser Ser Met Glu Thr Asp Leu Lys Ser  
 35 40 45

35

Thr Phe Leu Asn Val Tyr Ser Val Leu Lys Ser Asp Leu Leu His Asp  
 50 55 60

40

Pro Ser Phe Glu Phe Thr Asn Glu Ser Arg Leu Trp Val Asp Arg Met  
 65 70 75 80

Leu Asp Tyr Asn Val Arg Gly Gly Lys Leu Asn Arg Gly Leu Ser Val  
 85 90 95

45

Val Asp Ser Phe Lys Leu Leu Lys Gln Gly Asn Asp Leu Thr Glu Gln  
 100 105 110

50

Glu Val Phe Leu Ser Cys Ala Leu Gly Trp Cys Ile Glu Trp Leu Gln  
 115 120 125

Ala Tyr Phe Leu Val Leu Asp Asp Ile Met Asp Asn Ser Val Thr Arg  
 130 135 140

5 Arg Gly Gln Pro Cys Trp Phe Arg Val Pro Gln Val Gly Met Val Ala  
 145 150 155 160

10 Ile Asn Asp Gly Ile Leu Leu Arg Asn His Ile His Arg Ile Leu Lys  
 165 170 175

15 Lys His Phe Arg Asp Lys Pro Tyr Tyr Val Asp Leu Val Asp Leu Phe  
 180 185 190

20 Asn Glu Val Glu Leu Gln Thr Ala Cys Gly Gln Met Ile Asp Leu Ile  
 195 200 205

25 Thr Thr Phe Glu Gly Glu Lys Asp Leu Ala Lys Tyr Ser Leu Ser Ile  
 210 215 220

30 His Arg Arg Ile Val Gln Tyr Lys Thr Ala Tyr Tyr Ser Phe Tyr Leu  
 225 230 235 240

35 Pro Val Ala Cys Ala Leu Leu Met Ala Gly Glu Asn Leu Glu Asn His  
 245 250 255

40 Ile Asp Val Lys Asn Val Leu Val Asp Met Gly Ile Tyr Phe Gln Val  
 260 265 270

45 Gln Asp Asp Tyr Leu Asp Cys Phe Ala Asp Pro Glu Thr Leu Gly Lys  
 275 280 285

50 Ile Gly Thr Asp Ile Glu Asp Phe Lys Cys Ser Trp Leu Val Val Lys  
 290 295 300

55 Ala Leu Glu Arg Cys Ser Glu Glu Gln Thr Lys Ile Leu Tyr Glu Asn  
 305 310 315 320

60 Tyr Gly Lys Pro Asp Pro Ser Asn Val Ala Lys Val Lys Asp Leu Tyr  
 325 330 335

65 Lys Glu Leu Asp Leu Glu Gly Val Phe Met Glu Tyr Glu Ser Lys Ser  
 340 345 350

Tyr Glu Lys Leu Thr Gly Ala Ile Glu Gly His Gln Ser Lys Ala Ile  
 355 360 365

5 Gln Ala Val Leu Lys Ser Phe Leu Ala Lys Ile Tyr Lys Arg Gln Lys  
 370 375 380

<210> 125

10

<211> 1101

<212> DNA

15 <213> Sinabs alba

<220>

20

<221> CDS

<222> (1)..(1101)

25 <223>

<400> 125

30 atg gct tct tca gtg act cct cta ggt tca tgg gtt ctt ctt cac cat 48  
 Met Ala Ser Ser Val Thr Pro Leu Gly Ser Trp Val Leu Leu His His  
 1 5 10 15

35 cat cct tca act atc tta acc caa tcc aga tcc aga tct cct cct tct 96  
 His Pro Ser Thr Ile Leu Thr Gln Ser Arg Ser Arg Ser Pro Pro Ser  
 20 25 30

40 ctc atc acc ctt aaa ccc atc tcc ctc act cca aaa cgc acc gtt tcg 144  
 Leu Ile Thr Leu Lys Pro Ile Ser Leu Thr Pro Lys Arg Thr Val Ser  
 35 40 45

tct tct tcc tcc tct tcc ctc atc acc aaa gaa gac aac aac ctc aaa 192  
 Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ile Thr Lys Glu Asp Asn Asn Leu Lys  
 50 55 60

45 tcc tct tcc tct tcc ttc gat ttc atg tct tac atc atc cgc aaa gcc 240  
 Ser Ser Ser Ser Ser Phe Asp Phe Met Ser Tyr Ile Ile Arg Lys Ala  
 65 70 75 80

50 gac tcc gtc aac aaa gcc tta gac tcc gcc gtc cct ctc cgg gag cca 288  
 Asp Ser Val Asn Lys Ala Leu Asp Ser Ala Val Pro Leu Arg Glu Pro  
 85 90 95

ctc aag atc cac gaa gcg atg cgt tac tct ctc ctc gcc gga gga aaa 336

## 165

	Leu Lys Ile His Glu Ala Met Arg Tyr Ser Leu Leu Ala Gly Gly Lys	
	100 105 110	
5	cgc gtc aga cca gtt ctc tgc atc gcc gcg tgc gag cta gtc gga gga Arg Val Arg Pro Val Leu Cys Ile Ala Ala Cys Glu Leu Val Gly Gly	384
	115 120 125	
10	gaa gag tct tta gct atg ccg gcg cgt tgc gcc gtg gaa atg atc cac Glu Glu Ser Leu Ala Met Pro Ala Arg Cys Ala Val Glu Met Ile His	432
	130 135 140	
15	acc atg tcg ttg atc cac gac gac ttg cct tgt atg gat aac gac gat Thr Met Ser Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Cys Met Asp Asn Asp Asp	480
	145 150 155 160	
20	ctc cgc cgc gga aag ccc acg aat cac aaa gtt tac ggc gaa gac gtg Leu Arg Arg Gly Lys Pro Thr Asn His Lys Val Tyr Gly Glu Asp Val	528
	165 170 175	
25	gcg gtt tta gcc gga gac gcg ctt ctt tcg ttc gcc ttc gag cat tta Ala Val Leu Ala Gly Asp Ala Leu Leu Ser Phe Ala Phe Glu His Leu	576
	180 185 190	
30	gcg tcg gct acg agc tcg gag gtt tct ccg gcg aga gtg gtt aga gct Ala Ser Ala Thr Ser Ser Glu Val Ser Pro Ala Arg Val Val Arg Ala	624
	195 200 205	
35	gtg gga gag ttg gct aaa gcc atc ggc acc gaa ggg ctc gtg gcg gga Val Gly Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Thr Glu Gly Leu Val Ala Gly	672
	210 215 220	
40	caa gtg gtg gat ata agc agt gaa ggg ttg gac tta aac aac gtc gga Gln Val Val Asp Ile Ser Ser Glu Gly Leu Asp Leu Asn Asn Val Gly	720
	225 230 235 240	
45	ttg gag cat ttg aag ttt ata cat ttg cat aaa acg gcg gcg ttg ctt Leu Glu His Leu Lys Phe Ile His Leu His Lys Thr Ala Ala Leu Leu	768
	245 250 255	
50	gaa gct tca gcg gtt ttg ggt ggg atc atc ggt gga ggg agt gat gaa Glu Ala Ser Ala Val Leu Gly Gly Ile Ile Gly Gly Gly Ser Asp Glu	816
	260 265 270	
55	gag atc gag agg ctg agg aag ttc gcg agg tgt att ggg ttg ttg ttt Glu Ile Glu Arg Leu Arg Lys Phe Ala Arg Cys Ile Gly Leu Leu Phe	864
	275 280 285	
60	cag gtg gtt gat gat atc ttg gac gtg acg aaa tcg tct caa gaa ctg Gln Val Val Asp Asp Ile Leu Asp Val Thr Lys Ser Ser Gln Glu Leu	912
	290 295 300	
65	ggg aaa acc gct ggg aaa gat ttg att gct gat aag ttg act tat ccg Gly Lys Thr Ala Gly Lys Asp Leu Ile Ala Asp Lys Leu Thr Tyr Pro	960
	305 310 315 320	

aag ctc atg ggt ttg gag aaa tcg aga gag ttc gct gag aag ttg aat 1008  
 Lys Leu Met Gly Leu Glu Lys Ser Arg Glu Phe Ala Glu Lys Leu Asn  
 325 330 335

5

aca gag gca cgt gat cag ctt tta ggg ttt gat tcc gac aag gtt gct 1056  
 Thr Glu Ala Arg Asp Gln Leu Leu Gly Phe Asp Ser Asp Lys Val Ala  
 340 345 350

10

cct ttg ttg gct ttg gct aat tac att gcc aat aga cag aac tga 1101  
 Pro Leu Leu Ala Leu Ala Asn Tyr Ile Ala Asn Arg Gln Asn  
 355 360 365

15

<210> 126

<211> 366

20

<212> PRT

<213> Sinabs alba

25

<400> 126

Met Ala Ser Ser Val Thr Pro Leu Gly Ser Trp Val Leu Leu His His  
 1 5 10 15

30

His Pro Ser Thr Ile Leu Thr Gln Ser Arg Ser Arg Ser Pro Pro Ser  
 20 25 30

35

Leu Ile Thr Leu Lys Pro Ile Ser Leu Thr Pro Lys Arg Thr Val Ser  
 35 40 45

40

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ile Thr Lys Glu Asp Asn Asn Leu Lys  
 50 55 60

45

Ser Ser Ser Ser Ser Phe Asp Phe Met Ser Tyr Ile Ile Arg Lys Ala  
 65 70 75 80

Asp Ser Val Asn Lys Ala Leu Asp Ser Ala Val Pro Leu Arg Glu Pro  
 85 90 95

50

Leu Lys Ile His Glu Ala Met Arg Tyr Ser Leu Leu Ala Gly Gly Lys  
 100 105 110

## 167

	Arg Val Arg Pro Val Leu Cys Ile Ala Ala Cys Glu Leu Val Gly Gly	
	115	120 125
5	Glu Glu Ser Leu Ala Met Pro Ala Arg Cys Ala Val Glu Met Ile His	
	130	135 140
10	Thr Met Ser Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Cys Met Asp Asn Asp Asp	
	145	150 155 160
15	Leu Arg Arg Gly Lys Pro Thr Asn His Lys Val Tyr Gly Glu Asp Val	
		165 170 175
20	Ala Val Leu Ala Gly Asp Ala Leu Leu Ser Phe Ala Phe Glu His Leu	
		180 185 190
25	Ala Ser Ala Thr Ser Ser Glu Val Ser Pro Ala Arg Val Val Arg Ala	
		195 200 205
30	Val Gly Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Thr Glu Gly Leu Val Ala Gly	
		210 215 220
35	Gln Val Val Asp Ile Ser Ser Glu Gly Leu Asp Leu Asn Asn Val Gly	
		225 230 235 240
40	Leu Glu His Leu Lys Phe Ile His Leu His Lys Thr Ala Ala Leu Leu	
		245 250 255
45	Glu Ala Ser Ala Val Leu Gly Gly Ile Ile Gly Gly Gly Ser Asp Glu	
		260 265 270
50	Glu Ile Glu Arg Leu Arg Lys Phe Ala Arg Cys Ile Gly Leu Leu Phe	
		275 280 285
55	Gln Val Val Asp Asp Ile Leu Asp Val Thr Lys Ser Ser Gln Glu Leu	
		290 295 300
60	Gly Lys Thr Ala Gly Lys Asp Leu Ile Ala Asp Lys Leu Thr Tyr Pro	
		305 310 315 320
65	Lys Leu Met Gly Leu Glu Lys Ser Arg Glu Phe Ala Glu Lys Leu Asn	
		325 330 335

Thr Glu Ala Arg Asp Gln Leu Leu Gly Phe Asp Ser Asp Lys Val Ala  
 340 345 350

5

Pro Leu Leu Ala Leu Ala Asn Tyr Ile Ala Asn Arg Gln Asn  
 355 360 365

10

<210> 127

<211> 930

15

<212> DNA

<213> Erwinia uredovora

20

<220>

<221> CDS

25

<222> (1)..(930)

<223>

30

<400> 127

atg aat aat ccg tcg tta ctc aat cat gcg gtc gaa acg atg gca gtt 48  
 Met Asn Asn Pro Ser Leu Leu Asn His Ala Val Glu Thr Met Ala Val  
 1 5 10 15

35

ggc tcg aaa agt ttt gcg aca gcc tca aag tta ttt gat gca aaa acc 96  
 Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp Ala Lys Thr  
 20 25 30

40

cgg cgc agc gta ctg atg ctc tac gcc tgg tgc cgc cat tgt gac gat 144  
 Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His Cys Asp Asp  
 35 40 45

45

gtt att gac gat cag acg ctg ggc ttt cag gcc cgg cag cct gcc tta 192  
 Val Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln Pro Ala Leu  
 50 55 60

50

caa acg ccc gaa caa cgt ctg atg caa ctt gag atg aaa acg cgc cag 240  
 Gln Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys Thr Arg Gln  
 65 70 75 80

gcc tat gca gga tcg cag atg cac gaa ccg gcg ttt gcg gct ttt cag 288  
 Ala Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala Ala Phe Gln  
 85 90 95

	gaa gtg gct atg gct cat gat atc gcc ccg gct tac gcg ttt gat cat	336
	Glu Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala Phe Asp His	
	100 105 110	
5	ctg gaa ggc ttc gcc atg gat gta cgc gaa gcg caa tac agc caa ctg	384
	Leu Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr Ser Gln Leu	
	115 120 125	
10	gat gat acg ctg cgc tat tgc tat cac gtt gca ggc gtt gtc ggc ttg	432
	Asp Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val Val Gly Leu	
	130 135 140	
15	atg atg gcg caa atc atg ggc gtg cgg gat aac gcc acg ctg gac cgc	480
	Met Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr Leu Asp Arg	
	145 150 155 160	
20	gcc tgt gac ctt ggg ctg gca ttt cag ttg acc aat att gct cgc gat	528
	Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile Ala Arg Asp	
	165 170 175	
25	att gtg gac gat gcg cat gcg ggc cgc tgt tat ctg ccg gca agc tgg	576
	Ile Val Asp Asp Ala His Ala Gly Arg Cys Tyr Leu Pro Ala Ser Trp	
	180 185 190	
30	ctg gag cat gaa ggt ctg aac aaa gag aat tat gcg gca cct gaa aac	624
	Leu Glu His Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala Pro Glu Asn	
	195 200 205	
35	cgt cag gcg ctg agc cgt atc gcc cgt cgt ttg gtg cag gaa gca gaa	672
	Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val Gln Glu Ala Glu	
	210 215 220	
40	cct tac tat ttg tct gcc aca gcc ggc ctg gca ggg ttg ccc ctg cgt	720
	Pro Tyr Tyr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu Pro Leu Arg	
	225 230 235 240	
45	tcc gcc tgg gca atc gct acg gcg aag cag gtt tac cgg aaa ata ggt	768
	Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg Lys Ile Gly	
	245 250 255	
50	gtc aaa gtt gaa cag gcc ggt cag caa gcc tgg gat cag cgg cag tca	816
	Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln Ala Trp Asp Gln Arg Gln Ser	
	260 265 270	
55	acg acc acg ccc gaa aaa tta acg ctg ctg ctg gcc gcc tct ggt cag	864
	Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala Ser Gly Gln	
	275 280 285	
60	gcc ctt act tcc cgg atg cgg gct cat cct ccc cgc cct gcg cat ctc	912
	Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro Ala His Leu	
	290 295 300	
	tgg cag cgc ccg ctc tag	930



Trp Gln Arg Pro Leu  
305

5 <210> 128  
 <211> 309  
 <212> PRT  
 10 <213> Erwinia uredovora

15 <400> 128  
 Met Asn Asn Pro Ser Leu Leu Asn His Ala Val Glu Thr Met Ala Val  
 1 5 10 15  
 20 Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp Ala Lys Thr  
 20 25 30  
 25 Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His Cys Asp Asp  
 35 40 45  
 30 Val Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln Pro Ala Leu  
 50 55 60  
 35 Gln Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys Thr Arg Gln  
 65 70 75 80  
 40 Ala Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala Ala Phe Gln  
 85 90 95  
 45 Glu Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala Phe Asp His  
 100 105 110  
 50 Leu Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr Ser Gln Leu  
 115 120 125  
 Asp Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val Val Gly Leu  
 130 135 140  
 Met Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr Leu Asp Arg  
 145 150 155 160

Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile Ala Arg Asp  
 165 170 175  
 5  
 Ile Val Asp Asp Ala His Ala Gly Arg Cys Tyr Leu Pro Ala Ser Trp  
 180 185 190  
 10  
 Leu Glu His Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala Pro Glu Asn  
 195 200 205  
 15  
 Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val Gln Glu Ala Glu  
 210 215 220  
 20  
 Pro Tyr Tyr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu Pro Leu Arg  
 225 230 235 240  
 Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg Lys Ile Gly  
 245 250 255  
 25  
 Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln Ala Trp Asp Gln Arg Gln Ser  
 260 265 270  
 30  
 Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala Ser Gly Gln  
 275 280 285  
 35  
 Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro Ala His Leu  
 290 295 300  
 40  
 Trp Gln Arg Pro Leu  
 305  
 <210> 129  
 45 <211> 1479  
 <212> DNA  
 <213> Erwinia uredovora  
 50  
 <220>

5 <223>

10	atg	aaa	cca	act	acg	gta	att	ggg	gca	ggc	ttc	ggg	ctg	gca	ctg	48	
	Met	Lys	Pro	Thr	Thr	Val	Ile	Gly	Ala	Gly	Phe	Gly	Gly	Leu	Ala	Leu	
	1				5					10					15		
	gca	att	cgt	cta	caa	gct	gcg	ggg	atc	ccc	gtc	tta	ctg	ctt	gaa	caa	96
15	Ala	Ile	Arg	Leu	Gln	Ala	Ala	Gly	Ile	Pro	Val	Leu	Leu	Leu	Glu	Gln	
				20				25					30				
	cgt	gat	aaa	ccc	ggc	ggg	cgg	gct	tat	gtc	tac	gag	gat	cag	ggg	ttt	144
20	Arg	Asp	Lys	Pro	Gly	Gly	Arg	Ala	Tyr	Val	Tyr	Glu	Asp	Gln	Gly	Phe	
			35				40					45					
	acc	ttt	gat	gca	ggc	ccg	acg	gtt	atc	acc	gat	ccc	agt	gcc	att	gaa	192
25	Thr	Phe	Asp	Ala	Gly	Pro	Thr	Val	Ile	Thr	Asp	Pro	Ser	Ala	Ile	Glu	
		50					55				60						
	gaa	ctg	ttt	gca	ctg	gca	gga	aaa	cag	tta	aaa	gag	tat	gtc	gaa	ctg	240
	Glu	Leu	Phe	Ala	Leu	Ala	Gly	Lys	Gln	Leu	Lys	Glu	Tyr	Val	Glu	Leu	
	65					70					75				80		
30	ctg	ccg	gtt	acg	ccg	ttt	tac	cgc	ctg	tgt	tgg	gag	tca	ggg	aag	gtc	288
	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Phe	Tyr	Arg	Leu	Cys	Trp	Glu	Ser	Gly	Lys	Val	
					85				90					95			
	ttt	aat	tac	gat	aac	gat	caa	acc	cgg	ctc	gaa	gcg	cag	att	cag	cag	336
35	Phe	Asn	Tyr	Asp	Asn	Asp	Gln	Thr	Arg	Leu	Glu	Ala	Gln	Ile	Gln	Gln	
				100				105					110				
	ttt	aat	ccc	cgc	gat	gtc	gaa	ggg	tat	cgt	cag	ttt	ctg	gac	tat	tca	384
40	Phe	Asn	Pro	Arg	Asp	Val	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gln	Phe	Leu	Asp	Tyr	Ser	
			115					120					125				
	cgc	gcg	gtg	ttt	aaa	gaa	ggc	tat	cta	aag	ctc	ggg	act	gtc	cct	ttt	432
45	Arg	Ala	Val	Phe	Lys	Glu	Gly	Tyr	Leu	Lys	Leu	Gly	Thr	Val	Pro	Phe	
		130					135					140					
	tta	tcg	ttc	aga	gac	atg	ctt	cgc	gcc	gca	cct	caa	ctg	gcg	aaa	ctg	480
	Leu	Ser	Phe	Arg	Asp	Met	Leu	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu	
	145					150					155					160	
50	cag	gca	tgg	aga	agc	gtt	tac	agt	aag	gtt	gcc	agt	tac	atc	gaa	gat	528
	Gln	Ala	Trp	Arg	Ser	Val	Tyr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Tyr	Ile	Glu	Asp	
					165					170					175		
	gaa	cat	ctg	cgc	cag	gcg	ttt	tct	ttc	cac	tcg	ctg	ttg	gtg	ggc	ggc	576

173

	Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly	
	180 185 190	
5	aat ccc ttc gcc acc tca tcc att tat acg ttg ata cac gcg ctg gag Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu	624
	195 200 205	
10	cgt gag tgg ggc gtc tgg ttt ccg cgt ggc ggc acc ggc gca tta gtt Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val	672
	210 215 220	
15	cag ggg atg ata aag ctg ttt cag gat ctg ggt ggc gaa gtc gtg tta Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly Gly Glu Val Val Leu	720
	225 230 235 240	
20	aac gcc aga gtc agc cat atg gaa acg aca gga aac aag att gaa gcc Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly Asn Lys Ile Glu Ala	768
	245 250 255	
25	gtg cat tta gag gac ggt cgc agg ttc ctg acg caa gcc gtc gcg tca Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr Gln Ala Val Ala Ser	816
	260 265 270	
30	aat gca gat gtg gtt cat acc tat cgc gac ctg tta agc cag cac cct Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Ser Gln His Pro	864
	275 280 285	
35	gcc gcg gtt aag cag tcc aac aaa ctg cag act aag cgc atg agt aac Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr Lys Arg Met Ser Asn	912
	290 295 300	
40	tct ctg ttt gtg ctc tat ttt ggt ttg aat cac cat cat gat cag ctc Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His His His Asp Gln Leu	960
	305 310 315 320	
45	gcg cat cac acg gtt tgt ttc ggc ccg cgt tac cgc gag ctg att gac Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp	1008
	325 330 335	
50	gaa att ttt aat cat gat ggc ctc gca gag gac ttc tca ctt tat ctg Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Leu	1056
	340 345 350	
55	cac gcg ccc tgt gtc acg gat tgc tca ctg gcg cct gaa ggt tgc ggc His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly Cys Gly	1104
	355 360 365	
60	agt tac tat gtg ttg gcg ccg gtg ccg cat tta ggc acc gcg aac ctc Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala Asn Leu	1152
	370 375 380	
65	gac tgg acg gtt gag ggg cca aaa cta cgc gac cgt att ttt gcg tac Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Ala Tyr	1200
	385 390 395 400	

ctt gag cag cat tac atg cct ggc tta cgg agt cag ctg gtc acg cac 1248  
 Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr His  
 405 410 415  
 5  
 cgg atg ttt acg ccg ttt gat ttt cgc gac cag ctt aat gcc tat cat 1296  
 Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala Tyr His  
 420 425 430  
 10  
 ggc tca gcc ttt tct gtg gag ccc gtt ctt acc cag agc gcc tgg ttt 1344  
 Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe  
 435 440 445  
 15  
 cgg ccg cat aac cgc gat aaa acc att act aat ctc tac ctg gtc ggc 1392  
 Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu Tyr Leu Val Gly  
 450 455 460  
 20  
 gca ggc acg cat ccc ggc gca ggc att cct ggc gtc atc ggc tcg gca 1440  
 Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala  
 465 470 475 480  
 aaa gcg aca gca ggt ttg atg ctg gag gat ctg ata tga 1479  
 Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile  
 485 490  
 25  
 <210> 130  
 <211> 492  
 30  
 <212> PRT  
 <213> Erwinia uredovora  
 35  
 <400> 130  
 40  
 Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln  
 20 25 30  
 45  
 Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe  
 35 40 45  
 50  
 Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala Ile Glu  
 50 55 60

## 175

	Glu	Leu	Phe	Ala	Leu	Ala	Gly	Lys	Gln	Leu	Lys	Glu	Tyr	Val	Glu	Leu	
	65					70					75					80	
5	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Phe	Tyr	Arg	Leu	Cys	Trp	Glu	Ser	Gly	Lys	Val	
					85					90					95		
10	Phe	Asn	Tyr	Asp	Asn	Asp	Gln	Thr	Arg	Leu	Glu	Ala	Gln	Ile	Gln	Gln	
				100					105						110		
15	Phe	Asn	Pro	Arg	Asp	Val	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gln	Phe	Leu	Asp	Tyr	Ser	
				115				120						125			
20	Arg	Ala	Val	Phe	Lys	Glu	Gly	Tyr	Leu	Lys	Leu	Gly	Thr	Val	Pro	Phe	
		130					135						140				
25	Leu	Ser	Phe	Arg	Asp	Met	Leu	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu	
	145					150					155					160	
30	Gln	Ala	Trp	Arg	Ser	Val	Tyr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Tyr	Ile	Glu	Asp	
					165					170					175		
35	Glu	His	Leu	Arg	Gln	Ala	Phe	Ser	Phe	His	Ser	Leu	Leu	Val	Gly	Gly	
				180					185						190		
40	Asn	Pro	Phe	Ala	Thr	Ser	Ser	Ile	Tyr	Thr	Leu	Ile	His	Ala	Leu	Glu	
				195				200					205				
45	Arg	Glu	Trp	Gly	Val	Trp	Phe	Pro	Arg	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	Val	
		210					215					220					
50	Gln	Gly	Met	Ile	Lys	Leu	Phe	Gln	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	Val	Val	Leu	
	225					230					235					240	
55	Asn	Ala	Arg	Val	Ser	His	Met	Glu	Thr	Thr	Gly	Asn	Lys	Ile	Glu	Ala	
					245					250					255		
60	Val	His	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Arg	Phe	Leu	Thr	Gln	Ala	Val	Ala	Ser	
				260					265						270		
65	Asn	Ala	Asp	Val	Val	His	Thr	Tyr	Arg	Asp	Leu	Leu	Ser	Gln	His	Pro	
				275					280				285				

Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr Lys Arg Met Ser Asn  
290 295 300

5

Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His His His Asp Gln Leu  
305 310 315 320

10

Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp  
325 330 335

15

Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Leu  
340 345 350

20

His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly Cys Gly  
355 360 365

25

Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala Asn Leu  
370 375 380

30

Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Ala Tyr  
385 390 395 400

35

Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr His  
405 410 415

40

Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala Tyr His  
420 425 430

45

Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe  
435 440 445

50

Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu Tyr Leu Val Gly  
450 455 460

Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala  
465 470 475 480

Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile  
485 490

<210> 131  
 <211> 1725  
 5 <212> DNA  
 <213> *Narcissus pseudonarcissus*  
 10  
 <220>  
 <221> CDS  
 15 <222> (1)..(1725)  
 <223>  
 20  
 <400> 131  
 atg gct tct tcc act tgt tta att cat tct tcc tct ttt ggg gtt gga 48  
 Met Ala Ser Ser Thr Cys Leu Ile His Ser Ser Ser Phe Gly Val Gly  
 1 5 10 15  
 25  
 gga aag aaa gtg aag atg aac acg atg att cga tcg aag ttg ttt tca 96  
 Gly Lys Lys Val Lys Met Asn Thr Met Ile Arg Ser Lys Leu Phe Ser  
 20 25 30  
 30  
 att cgg tcg gct ttg gac act aag gtg tct gat atg agc gtc aat gct 144  
 Ile Arg Ser Ala Leu Asp Thr Lys Val Ser Asp Met Ser Val Asn Ala  
 35 40 45  
 35  
 cca aaa gga ttg ttt cca cca gag cct gag cac tac agg ggg cca aag 192  
 Pro Lys Gly Leu Phe Pro Pro Glu Pro Glu His Tyr Arg Gly Pro Lys  
 50 55 60  
 40  
 ctt aaa gtg gct atc att gga gct ggg ctc gct ggc atg tca act gca 240  
 Leu Lys Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Gly Met Ser Thr Ala  
 65 70 75 80  
 45  
 gtg gag ctt ttg gat caa ggg cat gag gtt gac ata tat gaa tcc aga 288  
 Val Glu Leu Leu Asp Gln Gly His Glu Val Asp Ile Tyr Glu Ser Arg  
 85 90 95  
 45  
 caa ttt att ggt ggt aaa gtc ggt tct ttt gta gat aag cgt gga aac 336  
 Gln Phe Ile Gly Gly Lys Val Gly Ser Phe Val Asp Lys Arg Gly Asn  
 100 105 110  
 50  
 cat att gaa atg gga ctc cat gtg ttt ttt ggt tgc tat aac aat ctt 384  
 His Ile Glu Met Gly Leu His Val Phe Phe Gly Cys Tyr Asn Asn Leu  
 115 120 125  
 ttc aga ctt atg aaa aag gta ggt gca gat gaa aat tta ctg gtg aag 432



	Phe	Arg	Leu	Met	Lys	Lys	Val	Gly	Ala	Asp	Glu	Asn	Leu	Leu	Val	Lys	
	130						135					140					
5	gat	cat	act	cat	acc	ttt	gta	aac	cga	ggt	gga	gaa	att	ggt	gaa	ctt	480
	Asp	His	Thr	His	Thr	Phe	Val	Asn	Arg	Gly	Gly	Glu	Ile	Gly	Glu	Leu	
	145					150				155					160		
10	gat	ttc	cga	ctt	ccg	atg	ggt	gca	cca	tta	cat	ggt	att	cgt	gca	ttt	528
	Asp	Phe	Arg	Leu	Pro	Met	Gly	Ala	Pro	Leu	His	Gly	Ile	Arg	Ala	Phe	
					165					170					175		
15	cta	aca	act	aat	caa	ctg	aag	cct	tat	gat	aaa	gca	agg	aat	gct	gtg	576
	Leu	Thr	Thr	Asn	Gln	Leu	Lys	Pro	Tyr	Asp	Lys	Ala	Arg	Asn	Ala	Val	
				180					185					190			
20	gct	ctt	gcc	ctt	agc	cca	gtt	gta	cgt	gct	ctt	att	gat	cca	aat	ggt	624
	Ala	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Val	Val	Arg	Ala	Leu	Ile	Asp	Pro	Asn	Gly	
			195					200					205				
25	gca	atg	cag	gat	ata	agg	aac	tta	gat	aat	att	agc	ttt	tct	gat	tgg	672
	Ala	Met	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn	Leu	Asp	Asn	Ile	Ser	Phe	Ser	Asp	Trp	
		210					215					220					
30	ttc	tta	tcc	aaa	ggc	ggt	acc	cgc	atg	agc	atc	caa	agg	atg	tgg	gat	720
	Phe	Leu	Ser	Lys	Gly	Gly	Thr	Arg	Met	Ser	Ile	Gln	Arg	Met	Trp	Asp	
	225				230						235				240		
35	cca	gtt	gct	tat	gcc	ctc	gga	ttt	att	gac	tgt	gat	aat	atc	agt	gcc	768
	Pro	Val	Ala	Tyr	Ala	Leu	Gly	Phe	Ile	Asp	Cys	Asp	Asn	Ile	Ser	Ala	
				245						250					255		
40	cgt	tgt	atg	ctt	act	ata	ttt	tct	cta	ttt	gct	act	aag	aca	gaa	gct	816
	Arg	Cys	Met	Leu	Thr	Ile	Phe	Ser	Leu	Phe	Ala	Thr	Lys	Thr	Glu	Ala	
				260					265					270			
45	tct	ctg	ttg	cgt	atg	ttg	aag	ggt	tcg	cct	gat	gtt	tac	tta	agc	ggt	864
	Ser	Leu	Leu	Arg	Met	Leu	Lys	Gly	Ser	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Ser	Gly	
			275					280					285				
50	cct	ata	aga	aag	tat	att	aca	gat	aaa	ggt	gga	agg	ttt	cac	cta	agg	912
	Pro	Ile	Arg	Lys	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Gly	Gly	Arg	Phe	His	Leu	Arg	
		290					295					300					
55	tgg	ggg	tgt	aga	gag	ata	ctt	tat	gat	gaa	cta	tca	aat	ggc	gac	aca	960
	Trp	Gly	Cys	Arg	Glu	Ile	Leu	Tyr	Asp	Glu	Leu	Ser	Asn	Gly	Asp	Thr	
	305				310					315					320		
60	tat	atc	aca	ggc	att	gca	atg	tcg	aag	gct	acc	aat	aaa	aaa	ctt	gtg	1008
	Tyr	Ile	Thr	Gly	Ile	Ala	Met	Ser	Lys	Ala	Thr	Asn	Lys	Lys	Leu	Val	
				325						330					335		
65	aaa	gct	gac	gtg	tat	gtt	gca	gca	tgt	gat	gtt	cct	gga	ata	aaa	agg	1056
	Lys	Ala	Asp	Val	Tyr	Val	Ala	Ala	Cys	Asp	Val	Pro	Gly	Ile	Lys	Arg	
				340					345					350			

	ttg atc cca tcg gag tgg aga gaa tgg gat cta ttt gac aat atc tat	1104
	Leu Ile Pro Ser Glu Trp Arg Glu Trp Asp Leu Phe Asp Asn Ile Tyr	
	355 360 365	
5	aaa cta gtt gga gtt cca gtt gtc act gtt cag ctt agg tac aat ggt	1152
	Lys Leu Val Gly Val Pro Val Val Thr Val Gln Leu Arg Tyr Asn Gly	
	370 375 380	
10	tgg gtg aca gag atg caa gat ctg gaa aaa tca agg cag ttg aga gct	1200
	Trp Val Thr Glu Met Gln Asp Leu Glu Lys Ser Arg Gln Leu Arg Ala	
	385 390 395 400	
15	gca gta gga ttg gat aat ctt ctt tat act cca gat gca gac ttt tct	1248
	Ala Val Gly Leu Asp Asn Leu Leu Tyr Thr Pro Asp Ala Asp Phe Ser	
	405 410 415	
20	tgt ttt tct gat ctt gca ctc tcg tcg cct gaa gat tat tat att gaa	1296
	Cys Phe Ser Asp Leu Ala Leu Ser Ser Pro Glu Asp Tyr Tyr Ile Glu	
	420 425 430	
	gga caa ggg tcc cta ata cag gct gtt ctc acg cca ggg gat cca tac	1344
	Gly Gln Gly Ser Leu Ile Gln Ala Val Leu Thr Pro Gly Asp Pro Tyr	
	435 440 445	
25	atg ccc cta cct aat gat gca att ata gaa aga gtt cgg aaa cag gtt	1392
	Met Pro Leu Pro Asn Asp Ala Ile Ile Glu Arg Val Arg Lys Gln Val	
	450 455 460	
30	ttg gat tta ttc cca tcc tct caa ggc ctg gaa gtt cta tgg tct tcg	1440
	Leu Asp Leu Phe Pro Ser Ser Gln Gly Leu Glu Val Leu Trp Ser Ser	
	465 470 475 480	
35	gtg gtt aaa atc gga caa tcc cta tat cgg gag ggg cct gga aag gac	1488
	Val Val Lys Ile Gly Gln Ser Leu Tyr Arg Glu Gly Pro Gly Lys Asp	
	485 490 495	
40	cca ttc aga cct gat cag aag aca cca gta aaa aat ttc ttc ctt gca	1536
	Pro Phe Arg Pro Asp Gln Lys Thr Pro Val Lys Asn Phe Phe Leu Ala	
	500 505 510	
	ggt tca tac acc aaa cag gat tac att gac agt atg gaa gga gcg acc	1584
	Gly Ser Tyr Thr Lys Gln Asp Tyr Ile Asp Ser Met Glu Gly Ala Thr	
	515 520 525	
45	cta tcg ggg aga caa gca gct gca tat atc tgc agc gcc ggt gaa gat	1632
	Leu Ser Gly Arg Gln Ala Ala Ala Tyr Ile Cys Ser Ala Gly Glu Asp	
	530 535 540	
50	ctg gca gca ctt cgc aag aag atc gct gct gat cat cca gag caa ctg	1680
	Leu Ala Ala Leu Arg Lys Lys Ile Ala Ala Asp His Pro Glu Gln Leu	
	545 550 555 560	
	atc aac aaa gat tct aac gtg tcg gat gaa ctg agt ctc gta taa	1725

Ile Asn Lys Asp Ser Asn Val Ser Asp Glu Leu Ser Leu Val  
 565 570

5 <210> 132

<211> 574

<212> PRT

10

<213> Narcissus pseudonarcissus

15 <400> 132

Met Ala Ser Ser Thr Cys Leu Ile His Ser Ser Ser Phe Gly Val Gly  
 1 5 10 15

20

Gly Lys Lys Val Lys Met Asn Thr Met Ile Arg Ser Lys Leu Phe Ser  
 20 25 30

25

Ile Arg Ser Ala Leu Asp Thr Lys Val Ser Asp Met Ser Val Asn Ala  
 35 40 45

30

Pro Lys Gly Leu Phe Pro Pro Glu Pro Glu His Tyr Arg Gly Pro Lys  
 50 55 60

35

Leu Lys Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Gly Met Ser Thr Ala  
 65 70 75 80

Val Glu Leu Leu Asp Gln Gly His Glu Val Asp Ile Tyr Glu Ser Arg  
 85 90 95

40

Gln Phe Ile Gly Gly Lys Val Gly Ser Phe Val Asp Lys Arg Gly Asn  
 100 105 110

45

His Ile Glu Met Gly Leu His Val Phe Phe Gly Cys Tyr Asn Asn Leu  
 115 120 125

50

Phe Arg Leu Met Lys Lys Val Gly Ala Asp Glu Asn Leu Leu Val Lys  
 130 135 140

Asp His Thr His Thr Phe Val Asn Arg Gly Gly Glu Ile Gly Glu Leu  
 145 150 155 160

Asp Phe Arg Leu Pro Met Gly Ala Pro Leu His Gly Ile Arg Ala Phe  
 165 170 175  
 5

Leu Thr Thr Asn Gln Leu Lys Pro Tyr Asp Lys Ala Arg Asn Ala Val  
 180 185 190

10

Ala Leu Ala Leu Ser Pro Val Val Arg Ala Leu Ile Asp Pro Asn Gly  
 195 200 205

15

Ala Met Gln Asp Ile Arg Asn Leu Asp Asn Ile Ser Phe Ser Asp Trp  
 210 215 220

20

Phe Leu Ser Lys Gly Gly Thr Arg Met Ser Ile Gln Arg Met Trp Asp  
 225 230 235 240

Pro Val Ala Tyr Ala Leu Gly Phe Ile Asp Cys Asp Asn Ile Ser Ala  
 245 250 255

25

Arg Cys Met Leu Thr Ile Phe Ser Leu Phe Ala Thr Lys Thr Glu Ala  
 260 265 270

30

Ser Leu Leu Arg Met Leu Lys Gly Ser Pro Asp Val Tyr Leu Ser Gly  
 275 280 285

35

Pro Ile Arg Lys Tyr Ile Thr Asp Lys Gly Gly Arg Phe His Leu Arg  
 290 295 300

40

Trp Gly Cys Arg Glu Ile Leu Tyr Asp Glu Leu Ser Asn Gly Asp Thr  
 305 310 315 320

Tyr Ile Thr Gly Ile Ala Met Ser Lys Ala Thr Asn Lys Lys Leu Val  
 325 330 335

45

Lys Ala Asp Val Tyr Val Ala Ala Cys Asp Val Pro Gly Ile Lys Arg  
 340 345 350

50

Leu Ile Pro Ser Glu Trp Arg Glu Trp Asp Leu Phe Asp Asn Ile Tyr  
 355 360 365

Lys Leu Val Gly Val Pro Val Val Thr Val Gln Leu Arg Tyr Asn Gly  
 370 375 380

5 Trp Val Thr Glu Met Gln Asp Leu Glu Lys Ser Arg Gln Leu Arg Ala  
 385 390 395 400

10 Ala Val Gly Leu Asp Asn Leu Leu Tyr Thr Pro Asp Ala Asp Phe Ser  
 405 410 415

15 Cys Phe Ser Asp Leu Ala Leu Ser Ser Pro Glu Asp Tyr Tyr Ile Glu  
 420 425 430

20 Gly Gln Gly Ser Leu Ile Gln Ala Val Leu Thr Pro Gly Asp Pro Tyr  
 435 440 445

25 Met Pro Leu Pro Asn Asp Ala Ile Ile Glu Arg Val Arg Lys Gln Val  
 450 455 460

30 Leu Asp Leu Phe Pro Ser Ser Gln Gly Leu Glu Val Leu Trp Ser Ser  
 465 470 475 480

35 Val Val Lys Ile Gly Gln Ser Leu Tyr Arg Glu Gly Pro Gly Lys Asp  
 485 490 495

40 Pro Phe Arg Pro Asp Gln Lys Thr Pro Val Lys Asn Phe Phe Leu Ala  
 500 505 510

45 Gly Ser Tyr Thr Lys Gln Asp Tyr Ile Asp Ser Met Glu Gly Ala Thr  
 515 520 525

50 Leu Ser Gly Arg Gln Ala Ala Ala Tyr Ile Cys Ser Ala Gly Glu Asp  
 530 535 540

45 Leu Ala Ala Leu Arg Lys Lys Ile Ala Ala Asp His Pro Glu Gln Leu  
 545 550 555 560

50 Ile Asn Lys Asp Ser Asn Val Ser Asp Glu Leu Ser Leu Val  
 565 570

&lt;211&gt; 1848

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

&lt;220&gt;

10

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1848)

15 &lt;223&gt;

&lt;400&gt; 133

20

atg tgt acc ttg agt ttt atg tat cct aat tca ctt ctt gat ggt acc 48  
 Met Cys Thr Leu Ser Phe Met Tyr Pro Asn Ser Leu Leu Asp Gly Thr  
 1 5 10 15

25

tgc aag act gta gct ttg ggt gat agc aaa cca aga tac aat aaa cag 96  
 Cys Lys Thr Val Ala Leu Gly Asp Ser Lys Pro Arg Tyr Asn Lys Gln  
 20 25 30

30

aga agt tct tgt ttt gac cct ttg ata att gga aat tgt act gat cag 144  
 Arg Ser Ser Cys Phe Asp Pro Leu Ile Ile Gly Asn Cys Thr Asp Gln  
 35 40 45

35

cag cag ctt tgt ggc ttg agt tgg ggg gtg gac aag gct aag gga aga 192  
 Gln Gln Leu Cys Gly Leu Ser Trp Gly Val Asp Lys Ala Lys Gly Arg  
 50 55 60

aga ggg ggt act gtt tcc aat ttg aaa gca gtt gta gat gta gac aaa 240  
 Arg Gly Gly Thr Val Ser Asn Leu Lys Ala Val Val Asp Val Asp Lys  
 65 70 75 80

40

aga gtg gag agc tat ggc agt agt gat gta gaa gga aat gag agt ggc 288  
 Arg Val Glu Ser Tyr Gly Ser Ser Asp Val Glu Gly Asn Glu Ser Gly  
 85 90 95

45

agc tat gat gcc att gtt ata ggt tca gga ata ggt gga ttg gtg gca 336  
 Ser Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ser Gly Ile Gly Gly Leu Val Ala  
 100 105 110

50

gcg acg cag ctg gcg gtt aag gga gct aag gtt tta gtt ctg gag aag 384  
 Ala Thr Gln Leu Ala Val Lys Gly Ala Lys Val Leu Val Leu Glu Lys  
 115 120 125

tat gtt att cct ggt gga agc tct ggc ttt tac gag agg gat ggt tat 432  
 Tyr Val Ile Pro Gly Gly Ser Ser Gly Phe Tyr Glu Arg Asp Gly Tyr  
 130 135 140

	aag ttt gat gtt ggt tca tca gtg atg ttt gga ttc agt gat aag gga Lys Phe Asp Val Gly Ser Ser Val Met Phe Gly Phe Ser Asp Lys Gly 145 150 155 160	480
5	aac ctc aat tta att act caa gca ttg gca gca gta gga cgt aaa tta Asn Leu Asn Leu Ile Thr Gln Ala Leu Ala Ala Val Gly Arg Lys Leu 165 170 175	528
10	gaa gtt ata cct gac cca aca act gta cat ttc cac ctg cca aat gac Glu Val Ile Pro Asp Pro Thr Thr Val His Phe His Leu Pro Asn Asp 180 185 190	576
15	ctt tct gtt cgt ata cac cga gag tat gat gac ttc att gaa gag ctt Leu Ser Val Arg Ile His Arg Glu Tyr Asp Asp Phe Ile Glu Glu Leu 195 200 205	624
20	gtg agt aaa ttt cca cat gaa aag gaa ggg att atc aaa ttt tac agt Val Ser Lys Phe Pro His Glu Lys Glu Gly Ile Ile Lys Phe Tyr Ser 210 215 220	672
25	gaa tgc tgg aag atc ttt aat tct ctg aat tca ttg gaa ctg aag tct Glu Cys Trp Lys Ile Phe Asn Ser Leu Asn Ser Leu Glu Leu Lys Ser 225 230 235 240	720
30	ttg gag gaa ccc atc tac ctt ttt ggc cag ttc ttt aag aag ccc ctt Leu Glu Glu Pro Ile Tyr Leu Phe Gly Gln Phe Phe Lys Lys Pro Leu 245 250 255	768
35	gaa tgc ttg act ctt gcc tac tat ttg ccc cag aat gct ggt agc atc Glu Cys Leu Thr Leu Ala Tyr Tyr Leu Pro Gln Asn Ala Gly Ser Ile 260 265 270	816
40	gct cgg aag tat ata aga gat cct ggg ttg ctg tct ttt ata gat gca Ala Arg Lys Tyr Ile Arg Asp Pro Gly Leu Leu Ser Phe Ile Asp Ala 275 280 285	864
45	gag tgc ttt atc gtg agt aca gtt aat gca tta caa aca cca atg atc Glu Cys Phe Ile Val Ser Thr Val Asn Ala Leu Gln Thr Pro Met Ile 290 295 300	912
50	aat gca agc atg gtt cta tgt gac aga cat ttt ggc gga atc aac tac Asn Ala Ser Met Val Leu Cys Asp Arg His Phe Gly Gly Ile Asn Tyr 305 310 315 320	960
55	ccc gtt ggt gga gtt ggc gag atc gcc aaa tcc tta gca aaa ggc ttg Pro Val Gly Gly Val Gly Glu Ile Ala Lys Ser Leu Ala Lys Gly Leu 325 330 335	1008
60	gat gat cac gga agt cag ata ctt tat agg gca aat gtt aca agt atc Asp Asp His Gly Ser Gln Ile Leu Tyr Arg Ala Asn Val Thr Ser Ile 340 345 350	1056
65	att ttg gac aat ggc aaa gct gtg gga gtg aag ctt tct gac ggg agg	1104

## 185

	Ile	Leu	Asp	Asn	Gly	Lys	Ala	Val	Gly	Val	Lys	Leu	Ser	Asp	Gly	Arg	
			355					360					365				
5	aag	ttt	tat	gct	aaa	acc	ata	gta	tcg	aat	gct	acc	aga	tgg	gat	act	1152
	Lys	Phe	Tyr	Ala	Lys	Thr	Ile	Val	Ser	Asn	Ala	Thr	Arg	Trp	Asp	Thr	
		370					375					380					
10	ttt	gga	aag	ctt	tta	aaa	gct	gag	aat	ctg	cca	aaa	gaa	gaa	gaa	aat	1200
	Phe	Gly	Lys	Leu	Leu	Lys	Ala	Glu	Asn	Leu	Pro	Lys	Glu	Glu	Glu	Asn	
	385					390					395					400	
15	ttc	cag	aaa	gct	tat	gta	aaa	gca	cct	tct	ttt	ctt	tct	att	cat	atg	1248
	Phe	Gln	Lys	Ala	Tyr	Val	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ile	His	Met	
				405					410					415			
	gga	gtt	aaa	gca	gat	gta	ctc	cca	cca	gac	aca	gat	tgt	cac	cat	ttt	1296
	Gly	Val	Lys	Ala	Asp	Val	Leu	Pro	Pro	Asp	Thr	Asp	Cys	His	His	Phe	
				420					425					430			
20	gtc	ctc	gag	gat	gat	tgg	aca	aat	ttg	gag	aaa	cca	tat	gga	agt	ata	1344
	Val	Leu	Glu	Asp	Asp	Trp	Thr	Asn	Leu	Glu	Lys	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ile	
			435					440					445				
25	ttc	ttg	agt	att	cca	aca	gtt	ctt	gat	tcc	tca	ttg	gcc	cca	gaa	gga	1392
	Phe	Leu	Ser	Ile	Pro	Thr	Val	Leu	Asp	Ser	Ser	Leu	Ala	Pro	Glu	Gly	
		450					455					460					
30	cac	cat	att	ctt	cac	att	ttt	aca	aca	tcg	agc	att	gaa	gat	tgg	gag	1440
	His	His	Ile	Leu	His	Ile	Phe	Thr	Thr	Ser	Ser	Ile	Glu	Asp	Trp	Glu	
	465					470				475						480	
35	gga	ctc	tct	ccg	aaa	gac	tat	gaa	gcg	aag	aaa	gag	gtt	gtt	gct	gaa	1488
	Gly	Leu	Ser	Pro	Lys	Asp	Tyr	Glu	Ala	Lys	Lys	Glu	Val	Val	Ala	Glu	
				485					490					495			
	agg	att	ata	agc	aga	ctt	gaa	aaa	aca	ctc	ttc	cca	ggg	ctt	aag	tca	1536
	Arg	Ile	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Phe	Pro	Gly	Leu	Lys	Ser	
				500					505					510			
40	tct	att	ctc	ttt	aag	gag	gtg	gga	act	cca	aag	acc	cac	aga	cga	tac	1584
	Ser	Ile	Leu	Phe	Lys	Glu	Val	Gly	Thr	Pro	Lys	Thr	His	Arg	Arg	Tyr	
			515					520					525				
45	ctt	gct	cgt	gat	agt	ggt	acc	tat	gga	cca	atg	cca	cgc	gga	aca	cct	1632
	Leu	Ala	Arg	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Gly	Pro	Met	Pro	Arg	Gly	Thr	Pro	
		530					535					540					
50	aag	gga	ctc	ctg	gga	atg	cct	ttc	aat	acc	act	gct	ata	gat	ggt	cta	1680
	Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Met	Pro	Phe	Asn	Thr	Thr	Ala	Ile	Asp	Gly	Leu	
	545					550					555					560	
	tat	tgt	gtt	ggc	gat	agt	tgc	ttc	cca	gga	caa	ggt	gtt	ata	gct	gta	1728
	Tyr	Cys	Val	Gly	Asp	Ser	Cys	Phe	Pro	Gly	Gln	Gly	Val	Ile	Ala	Val	
				565					570						575		



gcc ttt tca gga gta atg tgc gct cat cgt gtt gca gct gac tta ggg 1776  
 Ala Phe Ser Gly Val Met Cys Ala His Arg Val Ala Ala Asp Leu Gly  
 580 585 590

5 ttt gaa aaa aaa tca gat gtg ctg gac agt gct ctt ctt aga cta ctt 1824  
 Phe Glu Lys Lys Ser Asp Val Leu Asp Ser Ala Leu Leu Arg Leu Leu  
 595 600 605

10 ggt tgg tta agg aca cta gca tga 1848  
 Gly Trp Leu Arg Thr Leu Ala  
 610 615

15 <210> 134  
 <211> 615  
 <212> PRT  
 20 <213> Lycopersicon esculentum

25 <400> 134  
 Met Cys Thr Leu Ser Phe Met Tyr Pro Asn Ser Leu Leu Asp Gly Thr  
 1 5 10 15

30 Cys Lys Thr Val Ala Leu Gly Asp Ser Lys Pro Arg Tyr Asn Lys Gln  
 20 25 30

35 Arg Ser Ser Cys Phe Asp Pro Leu Ile Ile Gly Asn Cys Thr Asp Gln  
 35 40 45

40 Gln Gln Leu Cys Gly Leu Ser Trp Gly Val Asp Lys Ala Lys Gly Arg  
 50 55 60

Arg Gly Gly Thr Val Ser Asn Leu Lys Ala Val Val Asp Val Asp Lys  
 65 70 75 80

45 Arg Val Glu Ser Tyr Gly Ser Ser Asp Val Glu Gly Asn Glu Ser Gly  
 85 90 95

50 Ser Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ser Gly Ile Gly Gly Leu Val Ala  
 100 105 110

Ala Thr Gln Leu Ala Val Lys Gly Ala Lys Val Leu Val Leu Glu Lys  
 115 120 125

5 Tyr Val Ile Pro Gly Gly Ser Ser Gly Phe Tyr Glu Arg Asp Gly Tyr  
 130 135 140

10 Lys Phe Asp Val Gly Ser Ser Val Met Phe Gly Phe Ser Asp Lys Gly  
 145 150 155 160

Asn Leu Asn Leu Ile Thr Gln Ala Leu Ala Ala Val Gly Arg Lys Leu  
 165 170 175

15 Glu Val Ile Pro Asp Pro Thr Thr Val His Phe His Leu Pro Asn Asp  
 180 185 190

20 Leu Ser Val Arg Ile His Arg Glu Tyr Asp Asp Phe Ile Glu Glu Leu  
 195 200 205

25 Val Ser Lys Phe Pro His Glu Lys Glu Gly Ile Ile Lys Phe Tyr Ser  
 210 215 220

30 Glu Cys Trp Lys Ile Phe Asn Ser Leu Asn Ser Leu Glu Leu Lys Ser  
 225 230 235 240

Leu Glu Glu Pro Ile Tyr Leu Phe Gly Gln Phe Phe Lys Lys Pro Leu  
 245 250 255

35 Glu Cys Leu Thr Leu Ala Tyr Tyr Leu Pro Gln Asn Ala Gly Ser Ile  
 260 265 270

40 Ala Arg Lys Tyr Ile Arg Asp Pro Gly Leu Leu Ser Phe Ile Asp Ala  
 275 280 285

45 Glu Cys Phe Ile Val Ser Thr Val Asn Ala Leu Gln Thr Pro Met Ile  
 290 295 300

50 Asn Ala Ser Met Val Leu Cys Asp Arg His Phe Gly Gly Ile Asn Tyr  
 305 310 315 320

Pro Val Gly Gly Val Gly Glu Ile Ala Lys Ser Leu Ala Lys Gly Leu  
 325 330 335

Asp Asp His Gly Ser Gln Ile Leu Tyr Arg Ala Asn Val Thr Ser Ile  
 340 345 350  
 5  
 Ile Leu Asp Asn Gly Lys Ala Val Gly Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg  
 355 360 365  
 10  
 Lys Phe Tyr Ala Lys Thr Ile Val Ser Asn Ala Thr Arg Trp Asp Thr  
 370 375 380  
 15  
 Phe Gly Lys Leu Leu Lys Ala Glu Asn Leu Pro Lys Glu Glu Glu Asn  
 385 390 395 400  
 20  
 Phe Gln Lys Ala Tyr Val Lys Ala Pro Ser Phe Leu Ser Ile His Met  
 405 410 415  
 Gly Val Lys Ala Asp Val Leu Pro Pro Asp Thr Asp Cys His His Phe  
 420 425 430  
 25  
 Val Leu Glu Asp Asp Trp Thr Asn Leu Glu Lys Pro Tyr Gly Ser Ile  
 435 440 445  
 30  
 Phe Leu Ser Ile Pro Thr Val Leu Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly  
 450 455 460  
 35  
 His His Ile Leu His Ile Phe Thr Thr Ser Ser Ile Glu Asp Trp Glu  
 465 470 475 480  
 40  
 Gly Leu Ser Pro Lys Asp Tyr Glu Ala Lys Lys Glu Val Val Ala Glu  
 485 490 495  
 Arg Ile Ile Ser Arg Leu Glu Lys Thr Leu Phe Pro Gly Leu Lys Ser  
 500 505 510  
 45  
 Ser Ile Leu Phe Lys Glu Val Gly Thr Pro Lys Thr His Arg Arg Tyr  
 515 520 525  
 50  
 Leu Ala Arg Asp Ser Gly Thr Tyr Gly Pro Met Pro Arg Gly Thr Pro  
 530 535 540

Lys Gly Leu Leu Gly Met Pro Phe Asn Thr Thr Ala Ile Asp Gly Leu  
 545 550 555 560

5 Tyr Cys Val Gly Asp Ser Cys Phe Pro Gly Gln Gly Val Ile Ala Val  
 565 570 575

10 Ala Phe Ser Gly Val Met Cys Ala His Arg Val Ala Ala Asp Leu Gly  
 580 585 590

15 Phe Glu Lys Lys Ser Asp Val Leu Asp Ser Ala Leu Leu Arg Leu Leu  
 595 600 605

Gly Trp Leu Arg Thr Leu Ala  
 610 615

20 <210> 135  
 <211> 1233

25 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta

30 <220>  
 <221> CDS

35 <222> (1)..(1233)  
 <223>

40 <400> 135  
 atg gcc aca cac aaa ctc ctt caa ttc acc acc aat ctc cca cca tct 48  
 Met Ala Thr His Lys Leu Leu Gln Phe Thr Thr Asn Leu Pro Pro Ser  
 1 5 10 15

45 tct tct tca atc tct act ggc tgt tca ctc tcc ccc ttc ttc ctc aaa 96  
 Ser Ser Ser Ile Ser Thr Gly Cys Ser Leu Ser Pro Phe Phe Leu Lys  
 20 25 30

50 tca tct tct cat tcc cct aac cct cgc cga cac cgc cgc tcc gcc gta 144  
 Ser Ser Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Arg His Arg Arg Ser Ala Val  
 35 40 45

tgc tgc tct ttc gcc tca ctc gac tct gca aaa atc aaa gtc gtt ggc 192

## 190

	Cys	Cys	Ser	Phe	Ala	Ser	Leu	Asp	Ser	Ala	Lys	Ile	Lys	Val	Val	Gly	
	50						55					60					
5	gtc	ggt	ggt	ggt	ggc	aac	aat	gcc	gtt	aac	cgc	atg	att	ggt	agc	ggc	240
	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Asn	Ala	Val	Asn	Arg	Met	Ile	Gly	Ser	Gly	
	65					70				75						80	
10	tta	cag	ggt	gtt	gat	ttt	tac	gcc	att	aac	acg	gac	tca	caa	gcg	ctt	288
	Leu	Gln	Gly	Val	Asp	Phe	Tyr	Ala	Ile	Asn	Thr	Asp	Ser	Gln	Ala	Leu	
					85					90					95		
15	ctg	caa	tct	gtt	gca	cat	aac	cct	att	caa	att	ggg	gag	ctt	ttg	act	336
	Leu	Gln	Ser	Val	Ala	His	Asn	Pro	Ile	Gln	Ile	Gly	Glu	Leu	Leu	Thr	
					100					105					110		
20	cgt	gga	tta	ggt	act	ggt	ggg	aac	ccg	ctt	ttg	gga	gaa	cag	gct	gcg	384
	Arg	Gly	Leu	Gly	Thr	Gly	Gly	Asn	Pro	Leu	Leu	Gly	Glu	Gln	Ala	Ala	
					115				120					125			
25	gag	gag	tcg	aag	gaa	gcg	att	ggg	aat	gcg	ctt	aaa	ggg	tcg	gat	ctt	432
	Glu	Glu	Ser	Lys	Glu	Ala	Ile	Gly	Asn	Ala	Leu	Lys	Gly	Ser	Asp	Leu	
					130				135				140				
30	gtg	ttt	ata	aca	gca	ggt	atg	ggt	ggt	ggg	acg	ggt	tcg	ggt	gct	gct	480
	Val	Phe	Ile	Thr	Ala	Gly	Met	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Ser	Gly	Ala	Ala	
					145						155					160	
35	cca	gtt	gta	gcg	cag	ata	gcg	aaa	gaa	gca	ggg	tat	tta	act	gtt	ggt	528
	Pro	Val	Val	Ala	Gln	Ile	Ala	Lys	Glu	Ala	Gly	Tyr	Leu	Thr	Val	Gly	
					165						170					175	
40	gtt	gta	acg	tac	cca	ttc	agc	ttt	gaa	ggc	cgt	aaa	aga	tca	gta	cag	576
	Val	Val	Thr	Tyr	Pro	Phe	Ser	Phe	Glu	Gly	Arg	Lys	Arg	Ser	Val	Gln	
					180						185				190		
45	gcg	tta	gag	gct	att	gag	aag	ctg	caa	aag	aac	gtt	gac	aca	ctt	ata	624
	Ala	Leu	Glu	Ala	Ile	Glu	Lys	Leu	Gln	Lys	Asn	Val	Asp	Thr	Leu	Ile	
					195						200				205		
50	gtg	att	cca	aat	gac	cgt	ttg	ctg	gat	att	gct	gat	gaa	aac	acg	cct	672
	Val	Ile	Pro	Asn	Asp	Arg	Leu	Leu	Asp	Ile	Ala	Asp	Glu	Asn	Thr	Pro	
					210				215				220				
55	ctt	cag	gat	gct	ttt	ctt	ctt	gct	gat	gat	gta	ctc	cgc	caa	gga	gtt	720
	Leu	Gln	Asp	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Gln	Gly	Val	
					225				230				235			240	
60	caa	gga	atc	tca	gat	ata	att	aca	ata	cct	ggg	ctg	gta	aat	gtg	gac	768
	Gln	Gly	Ile	Ser	Asp	Ile	Ile	Thr	Ile	Pro	Gly	Leu	Val	Asn	Val	Asp	
					245					250					255		
65	ttt	gca	gac	gtt	aaa	gca	gtc	atg	aaa	gat	tct	gga	act	gca	atg	ctt	816
	Phe	Ala	Asp	Val	Lys	Ala	Val	Met	Lys	Asp	Ser	Gly	Thr	Ala	Met	Leu	
					260					265					270		

	ggt gtc ggt gtt tcc tca agt aaa aac cga gct gaa gaa gca gct gaa	864
	Gly Val Gly Val Ser Ser Ser Lys Asn Arg Ala Glu Glu Ala Ala Glu	
	275 280 285	
5	caa gca act ctt gct cct ttg att gga tca tca att caa tct gct aca	912
	Gln Ala Thr Leu Ala Pro Leu Ile Gly Ser Ser Ile Gln Ser Ala Thr	
	290 295 300	
10	ggt gtt gtt tat aat att acc gga ggg aag gac ata act cta caa gaa	960
	Gly Val Val Tyr Asn Ile Thr Gly Gly Lys Asp Ile Thr Leu Gln Glu	
	305 310 315 320	
15	gtc aac agg gtt tct cag gtg gta aca agt ttg gca gat cca tca gca	1008
	Val Asn Arg Val Ser Gln Val Val Thr Ser Leu Ala Asp Pro Ser Ala	
	325 330 335	
20	aac att ata ttc ggg gca gtg gta gat gag aga tac aac ggg gag att	1056
	Asn Ile Ile Phe Gly Ala Val Val Asp Glu Arg Tyr Asn Gly Glu Ile	
	340 345 350	
	cat gtg acc att gtt gct act ggc ttt gcc cag tcg ttt cag aaa tct	1104
	His Val Thr Ile Val Ala Thr Gly Phe Ala Gln Ser Phe Gln Lys Ser	
	355 360 365	
25	ctt ctt gct gac ccg aaa gga gca aaa ctt gtt gat aga aat caa gaa	1152
	Leu Leu Ala Asp Pro Lys Gly Ala Lys Leu Val Asp Arg Asn Gln Glu	
	370 375 380	
30	cct aca caa cct ttg act tcc gcg aga tct ttg aca aca cct tct cct	1200
	Pro Thr Gln Pro Leu Thr Ser Ala Arg Ser Leu Thr Thr Pro Ser Pro	
	385 390 395 400	
35	gct ccg tct cgg tct agg aaa ctc ttc ttt taa	1233
	Ala Pro Ser Arg Ser Arg Lys Leu Phe Phe	
	405 410	
40	<210> 136	
	<211> 410	
	<212> PRT	
45	<213> Tagetes erecta	
50	<400> 136	
	Met Ala Thr His Lys Leu Leu Gln Phe Thr Thr Asn Leu Pro Pro Ser	
	1 5 10 15	

## 192

	Ser	Ser	Ser	Ile	Ser	Thr	Gly	Cys	Ser	Leu	Ser	Pro	Phe	Phe	Leu	Lys	
				20					25						30		
5	Ser	Ser	Ser	His	Ser	Pro	Asn	Pro	Arg	Arg	His	Arg	Arg	Ser	Ala	Val	
			35				40					45					
10	Cys	Cys	Ser	Phe	Ala	Ser	Leu	Asp	Ser	Ala	Lys	Ile	Lys	Val	Val	Gly	
	50						55					60					
15	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Asn	Ala	Val	Asn	Arg	Met	Ile	Gly	Ser	Gly	
	65					70				75						80	
20	Leu	Gln	Gly	Val	Asp	Phe	Tyr	Ala	Ile	Asn	Thr	Asp	Ser	Gln	Ala	Leu	
				85						90				95			
25	Leu	Gln	Ser	Val	Ala	His	Asn	Pro	Ile	Gln	Ile	Gly	Glu	Leu	Leu	Thr	
				100					105				110				
30	Arg	Gly	Leu	Gly	Thr	Gly	Gly	Asn	Pro	Leu	Leu	Gly	Glu	Gln	Ala	Ala	
			115					120					125				
35	Glu	Glu	Ser	Lys	Glu	Ala	Ile	Gly	Asn	Ala	Leu	Lys	Gly	Ser	Asp	Leu	
	130						135					140					
40	Val	Phe	Ile	Thr	Ala	Gly	Met	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Ser	Gly	Ala	Ala	
	145					150					155					160	
45	Pro	Val	Val	Ala	Gln	Ile	Ala	Lys	Glu	Ala	Gly	Tyr	Leu	Thr	Val	Gly	
				165					170					175			
50	Val	Val	Thr	Tyr	Pro	Phe	Ser	Phe	Glu	Gly	Arg	Lys	Arg	Ser	Val	Gln	
				180					185					190			
55	Ala	Leu	Glu	Ala	Ile	Glu	Lys	Leu	Gln	Lys	Asn	Val	Asp	Thr	Leu	Ile	
			195					200					205				
60	Val	Ile	Pro	Asn	Asp	Arg	Leu	Leu	Asp	Ile	Ala	Asp	Glu	Asn	Thr	Pro	
	210						215					220					
65	Leu	Gln	Asp	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Gln	Gly	Val	
	225					230					235					240	

5 Gln Gly Ile Ser Asp Ile Ile Thr Ile Pro Gly Leu Val Asn Val Asp  
 245 250 255  
 Phe Ala Asp Val Lys Ala Val Met Lys Asp Ser Gly Thr Ala Met Leu  
 260 265 270  
 10 Gly Val Gly Val Ser Ser Ser Lys Asn Arg Ala Glu Glu Ala Ala Glu  
 275 280 285  
 15 Gln Ala Thr Leu Ala Pro Leu Ile Gly Ser Ser Ile Gln Ser Ala Thr  
 290 295 300  
 20 Gly Val Val Tyr Asn Ile Thr Gly Gly Lys Asp Ile Thr Leu Gln Glu  
 305 310 315 320  
 Val Asn Arg Val Ser Gln Val Val Thr Ser Leu Ala Asp Pro Ser Ala  
 325 330 335  
 25 Asn Ile Ile Phe Gly Ala Val Val Asp Glu Arg Tyr Asn Gly Glu Ile  
 340 345 350  
 30 His Val Thr Ile Val Ala Thr Gly Phe Ala Gln Ser Phe Gln Lys Ser  
 355 360 365  
 35 Leu Leu Ala Asp Pro Lys Gly Ala Lys Leu Val Asp Arg Asn Gln Glu  
 370 375 380  
 40 Pro Thr Gln Pro Leu Thr Ser Ala Arg Ser Leu Thr Thr Pro Ser Pro  
 385 390 395 400  
 Ala Pro Ser Arg Ser Arg Lys Leu Phe Phe  
 405 410  
 45  
 <210> 137  
 <211> 891  
 50  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta



&lt;220&gt;

5 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(891)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 137

15	atg aca tcc ctg agg ttt cta aca gaa ccc tca ctt gta tgc tca tcc	48
	Met Thr Ser Leu Arg Phe Leu Thr Glu Pro Ser Leu Val Cys Ser Ser	
	1 5 10 15	
20	act ttc ccc aca ttc aat ccc cta cac aaa acc cta act aaa cca aca	96
	Thr Phe Pro Thr Phe Asn Pro Leu His Lys Thr Leu Thr Lys Pro Thr	
	20 25 30	
25	cca aaa ccc tac cca aag cca cca cca att cgc tcc gtc ctt caa tac	144
	Pro Lys Pro Tyr Pro Lys Pro Pro Pro Ile Arg Ser Val Leu Gln Tyr	
	35 40 45	
30	aat cgc aaa cca gag ctc gcc gga gac act cca cga gtc gtc gca atc	192
	Asn Arg Lys Pro Glu Leu Ala Gly Asp Thr Pro Arg Val Val Ala Ile	
	50 55 60	
35	gac gcc gac gtt ggt cta cgt aac ctc gat ctt ctt ctc ggt ctc gaa	240
	Asp Ala Asp Val Gly Leu Arg Asn Leu Asp Leu Leu Leu Gly Leu Glu	
	65 70 75 80	
40	aac cgc gtc aat tac acc gtc gtt gaa gtt ctc aac ggc gat tgc aga	288
	Asn Arg Val Asn Tyr Thr Val Val Glu Val Leu Asn Gly Asp Cys Arg	
	85 90 95	
45	ctc gac caa gcc cta gtt cgt gat aaa cgc tgg tca aat ttc gaa ttg	336
	Leu Asp Gln Ala Leu Val Arg Asp Lys Arg Trp Ser Asn Phe Glu Leu	
	100 105 110	
50	ctt tgt att tca aaa cct agg tca aaa ttg cct tta gga ttt ggg gga	384
	Leu Cys Ile Ser Lys Pro Arg Ser Lys Leu Pro Leu Gly Phe Gly Gly	
	115 120 125	
55	aaa gct tta gtt tgg ctt gat gca tta aaa gat agg caa gaa ggt tgc	432
	Lys Ala Leu Val Trp Leu Asp Ala Leu Lys Asp Arg Gln Glu Gly Cys	
	130 135 140	
60	ccg gat ttt ata ctt ata gat tgt cct gca ggt att gat gcc ggg ttc	480
	Pro Asp Phe Ile Leu Ile Asp Cys Pro Ala Gly Ile Asp Ala Gly Phe	
	145 150 155 160	
65	ata acc gcc att aca ccg gct aac gaa gcc gta tta gtt aca aca cct	528

## 195

	Ile Thr Ala Ile Thr Pro Ala Asn Glu Ala Val Leu Val Thr Thr Pro	
	165 170 175	
5	gat att act gca ttg aga gat gca gat aga gtt aca ggc ttg ctt gaa Asp Ile Thr Ala Leu Arg Asp Ala Asp Arg Val Thr Gly Leu Leu Glu	576
	180 185 190	
10	tgt gat gga att agg gat att aaa atg att gtg aac aga gtt aga act Cys Asp Gly Ile Arg Asp Ile Lys Met Ile Val Asn Arg Val Arg Thr	624
	195 200 205	
15	gat ttg ata agg ggt gaa gat atg atg tca gtt ctt gat gtt caa gag Asp Leu Ile Arg Gly Glu Asp Met Met Ser Val Leu Asp Val Gln Glu	672
	210 215 220	
20	atg ttg gga ttg tca ttg ttg agt gat acc cga gga ttc gaa gtg att Met Leu Gly Leu Ser Leu Leu Ser Asp Thr Arg Gly Phe Glu Val Ile	720
	225 230 235 240	
25	cgg agt acg aat aga ggg ttt ccg ctt gtg ttg aac aag cct ccg act Arg Ser Thr Asn Arg Gly Phe Pro Leu Val Leu Asn Lys Pro Pro Thr	768
	245 250 255	
30	tta gca gga ttg gca ttt gag cag gct gct tgg aga ttg gtt gag caa Leu Ala Gly Leu Ala Phe Glu Gln Ala Ala Trp Arg Leu Val Glu Gln	816
	260 265 270	
35	gat agc atg aag gct gtg atg gtg gag gaa gaa cct aaa aag agg gga Asp Ser Met Lys Ala Val Met Val Glu Glu Glu Pro Lys Lys Arg Gly	864
	275 280 285	
40	ttt ttc tcg ttt ttt gga ggt tag tga Phe Phe Ser Phe Phe Gly Gly	891
	290 295	
45	<210> 138	
	<211> 295	
	<212> PRT	
	<213> Tagetes erecta	
50	<400> 138	
	Met Thr Ser Leu Arg Phe Leu Thr Glu Pro Ser Leu Val Cys Ser Ser	
	1 5 10 15	
	Thr Phe Pro Thr Phe Asn Pro Leu His Lys Thr Leu Thr Lys Pro Thr	
	20 25 30	

Pro Lys Pro Tyr Pro Lys Pro Pro Pro Ile Arg Ser Val Leu Gln Tyr  
 35 40 45  
 5

Asn Arg Lys Pro Glu Leu Ala Gly Asp Thr Pro Arg Val Val Ala Ile  
 50 55 60

10

Asp Ala Asp Val Gly Leu Arg Asn Leu Asp Leu Leu Leu Gly Leu Glu  
 65 70 75 80

15

Asn Arg Val Asn Tyr Thr Val Val Glu Val Leu Asn Gly Asp Cys Arg  
 85 90 95

20

Leu Asp Gln Ala Leu Val Arg Asp Lys Arg Trp Ser Asn Phe Glu Leu  
 100 105 110

25

Leu Cys Ile Ser Lys Pro Arg Ser Lys Leu Pro Leu Gly Phe Gly Gly  
 115 120 125

30

Lys Ala Leu Val Trp Leu Asp Ala Leu Lys Asp Arg Gln Glu Gly Cys  
 130 135 140

35

Pro Asp Phe Ile Leu Ile Asp Cys Pro Ala Gly Ile Asp Ala Gly Phe  
 145 150 155 160

40

Ile Thr Ala Ile Thr Pro Ala Asn Glu Ala Val Leu Val Thr Thr Pro  
 165 170 175

45

Asp Ile Thr Ala Leu Arg Asp Ala Asp Arg Val Thr Gly Leu Leu Glu  
 180 185 190

50

Cys Asp Gly Ile Arg Asp Ile Lys Met Ile Val Asn Arg Val Arg Thr  
 195 200 205

Asp Leu Ile Arg Gly Glu Asp Met Met Ser Val Leu Asp Val Gln Glu  
 210 215 220

Met Leu Gly Leu Ser Leu Leu Ser Asp Thr Arg Gly Phe Glu Val Ile  
 225 230 235 240

197

Arg	Ser	Thr	Asn	Arg	Gly	Phe	Pro	Leu	Val	Leu	Asn	Lys	Pro	Pro	Thr
				245					250					255	

**5**    Leu Ala Gly Leu Ala Phe Glu Gln Ala Ala Trp Arg Leu Val Glu Gln  
                    260  265   270

	Asp	Ser	Met	Lys	Ala	Val	Met	Val	Glu	Glu	Glu	Pro	Lys	Lys	Arg	Gly
10			275					280					285			

Phe Phe Ser Phe Phe Gly Gly  
290 295

<210> 139

<211> 332

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

25

<220>

30  $\langle 222 \rangle$  (1) .. (330)

```

35      <400> 139
      aag ctt gca cga gcc tct ctc tat ttt tac act tca atg gcg gca gca
      Lys Leu Ala Arg Ala Ser Leu Tyr Phe Tyr Thr Ser Met Ala Ala Ala
40      1          5          10          15

```

att gct gtc cct tgt agc tca aga cca ttt ggc tta ggt cga atg cgg 96  
Ile Ala Val Pro Cys Ser Ser Arg Pro Phe Gly Leu Gly Arg Met Arg  
20 25 30

45            tta ctt ggt cat aaa ccc aca acc ata act tgt cac ttc ccc ttt tct            144  
Leu Leu Gly His Lys Pro Thr Thr Ile Thr Cys His Phe Pro Phe Ser  
               35                          40                          45

50     ttt tct atc aaa tca ttt acc cca att gtt agg ggc aga aga tgt act            192  
Phe Ser Ile Lys Ser Phe Thr Pro Ile Val Arg Gly Arg Arg Cys Thr  
      50                  55                  60

gtt tgt ttt gtt gcc ggt ggc gac agt aat agt aac agt aat aat aat 240

198

Val Cys Phe Val Ala Gly Gly Asp Ser Asn Ser Asn Ser Asn Asn Asn  
 65 70 75 80

5 agt gac agt aat agt aat aat ccg ggt ctg gat tta aac ccg gcg gtt 288  
 Ser Asp Ser Asn Ser Asn Asn Pro Gly Leu Asp Leu Asn Pro Ala Val  
 85 90 95

10 atg aac cgt aac cgt ttg gtt gaa gaa aaa atg gag agg tcg ac 332  
 Met Asn Arg Asn Arg Leu Val Glu Glu Lys Met Glu Arg Ser  
 100 105 110

<210> 140

15 <211> 110

<212> PRT

20 <213> Tagetes erecta

<400> 140

25 Lys Leu Ala Arg Ala Ser Leu Tyr Phe Tyr Thr Ser Met Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

30 Ile Ala Val Pro Cys Ser Ser Arg Pro Phe Gly Leu Gly Arg Met Arg  
 20 25 30

35 Leu Leu Gly His Lys Pro Thr Thr Ile Thr Cys His Phe Pro Phe Ser  
 35 40 45

Phe Ser Ile Lys Ser Phe Thr Pro Ile Val Arg Gly Arg Arg Cys Thr  
 50 55 60

40 Val Cys Phe Val Ala Gly Gly Asp Ser Asn Ser Asn Ser Asn Asn Asn  
 65 70 75 80

45 Ser Asp Ser Asn Ser Asn Asn Pro Gly Leu Asp Leu Asn Pro Ala Val  
 85 90 95

50 Met Asn Arg Asn Arg Leu Val Glu Glu Lys Met Glu Arg Ser  
 100 105 110

<210> 141

<211> 332

<212> DNA

5 <213> Tagetes erceta

<220>

10 <221> misc\_feature

<222> (1)..(332)

15 <223> b-Hydroxylase Sense-Fragment

<400> 141

20 aagcttgac gagcctctct ctatcttttac acttcaatgg cggcagcaat tgctgtccct 60

tgtagctcaa gaccatttgg cttaggtcga atgcgggttac ttggtcataa acccacaacc 120

ataacttgct acttccccctt ttctttttct atcaaactcat ttacccaat tgtagggggc 180

25 agaagatgta ctgtttgttt tgttgccggt ggcgacagta atagtaacag taataataat 240

agtgacagta atagtaataa tccgggtctg gatttaaacc cggcggttat gaaccgtaac 300

30 cgttttggtg aagaaaaaat ggagaggtcg ac 332

<210> 142

35 <211> 332

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

40 <220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(332)

<223> b-Hydroxylase Antisense-Fragment

50 <400> 142

gaattcggca cgagcctctc tctatcttta caattcaatg gcggcagcaa ttgctgtccc 60

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**